

**PCT**ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL  
Oficina InternacionalSOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION  
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

<b>(51) Clasificación Internacional de Patentes <sup>7</sup> :</b> <b>C07K 14/495, 14/71, A61K 38/18</b>		<b>A1</b>	<b>(11) Número de publicación internacional:</b> <b>WO 00/31135</b> <b>(43) Fecha de publicación internacional:</b> 2 de Junio de 2000 (02.06.00)
<b>(21) Solicitud internacional:</b> PCT/ES99/00375 <b>(22) Fecha de la presentación internacional:</b> 23 de Noviembre de 1999 (23.11.99) <b>(30) Datos relativos a la prioridad:</b> P 9802465 24 de Noviembre de 1998 ES (24.11.98) <b>(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):</b> INSTITUTO CIENTIFICO Y TECNOLOGICO DE NAVARRA, S.A. [ES/ES]; Avenida Pío XII, 53, E-31008 Pamplona (ES). <b>(72) Inventores; e</b> <b>(75) Inventores/solicitantes (sólo US):</b> EZQUERRO SAENZ, Ignacio José [ES/ES]; Travesía Monasterio de Velate, 2-3º A, E-31011 Pamplona (ES). LASARTE SAGASTIBELZA, Juan José [ES/ES]; Avenida de Guipúzcoa, 24-3º, E-31195 Berriozar (ES). PRIETO VALTUENA, Jesús [ES/ES]; Tudela, 22-4º, E-31002 Pamplona (ES). BORRAS CUESTA, Francisco [ES/ES]; Montecampamento, 37-3º A, Mendillorri, E-31006 Pamplona (ES). <b>(74) Mandatario:</b> DE ELZABURU, Alberto; Miguel Angel, 21, E-28010 Madrid (ES).		<b>(81) Estados designados:</b> AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, Patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Patente europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Publicada</b> <i>Con informe de búsqueda internacional.</i>	
<b>(54) Title:</b> TGFβ1 INHIBITOR PEPTIDES <b>(54) Título:</b> PEPTIDOS INHIBIDORES DE TGFβ1 <b>(57) Abstract</b> Antagonists synthetic peptides which are obtained from TGFβ1 or from its receptors in the organism. It is possible to use either the peptides themselves or the genic sequences which code them and the recombinant systems which express them for the fabrication of compositions used in the treatment of hepatic diseases and more particularly in cases of fibrosis. These compositions may optionally include mimotopes of said active peptides. <b>(57) Resumen</b> Péptidos sintéticos antagonistas, obtenidos de TGFβ1 o de sus receptores en el organismo, que pueden ser utilizados en la fabricación, tanto por si solos, como las secuencias génicas que los codifican y los sistemas recombinantes que los expresen, en la fabricación de composiciones útiles para el tratamiento de enfermedades hepáticas y más concretamente en casos de fibrosis. Dichas composiciones pueden incluir opcionalmente mimotopos de dichos péptidos activos.			

### UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AL	Albania	ES	España	LS	Lesotho	SI	Eslovenia
AM	Armenia	FI	Finlandia	LT	Lituania	SK	Eslovaquia
AT	Austria	FR	Francia	LU	Luxemburgo	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabón	LV	Letonia	SZ	Swazilandia
AZ	Azerbaiyán	GB	Reino Unido	MC	Mónaco	TD	Chad
BA	Bosnia y Herzegovina	GE	Georgia	MD	República de Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tayikistán
BE	Bélgica	GN	Guinea	MK	Ex República Yugoslava de Macedonia	TM	Turkmenistán
BF	Burkina Faso	GR	Grecia	ML	Malí	TR	Turquía
BG	Bulgaria	HU	Hungría	MN	Mongolia	TT	Trinidad y Tabago
BJ	Benin	IE	Irlanda	MR	Mauritania	UA	Ucrania
BR	Brasil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarús	IS	Islandia	MX	México	US	Estados Unidos de América
CA	Canadá	IT	Italia	NE	Níger	UZ	Uzbekistán
CF	República Centroafricana	JP	Japón	NL	Países Bajos	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Noruega	YU	Yugoslavia
CH	Suiza	KG	Kirguistán	NZ	Nueva Zelandia	ZW	Zimbabue
CI	Côte d'Ivoire	KP	República Popular Democrática de Corea	PL	Polonia		
CM	Camerún	KR	República de Corea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakstán	RO	Rumania		
CU	Cuba	LC	Santa Lucía	RU	Federación de Rusia		
CZ	República Checa	LI	Liechtenstein	SD	Sudán		
DE	Alemania	LK	Sri Lanka	SE	Suecia		
DK	Dinamarca	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estonia						

- 1 -

**"PEPTIDOS INHIBIDORES DE TGF $\beta$ 1"**DESCRIPCIÓN DEL ESTADO DE LA TÉCNICA

5 El control del crecimiento celular está regulado por diferentes proteínas del grupo de los factores de crecimiento (Schalch DS y col (1979) *Endocrinology* 104:1143-1151). Entre los factores de crecimiento más importantes implicados en el desarrollo celular, capaces de actuar de  
10 forma autocrina y paracrina, se encuentran los factores transformantes del crecimiento (TGF, del inglés *Transforming Growth Factor*) (Braun L. y col. (1988) *Cell Biol* 85:1539-1543; Lyons RM y Moses HL (1990) *Eur. J. Biochem.* 187:467-473).

15 El término TGF se utilizó, por primera vez, para describir la actividad producida por una línea celular transformada con el virus del sarcoma murino (deLarco JE y Todaro GJ (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75:4001-4005; Mizel SB y col. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77:2205-2208). El  
20 sobrenadante de estas células fue capaz de inducir el normal crecimiento, en agar blando, de células que necesitan un soporte sólido para crecer. Estudios más específicos pusieron en evidencia dos clases de TGF, que se denominaron TGF $\alpha$  y TGF $\beta$ , que a su vez abarcan a familias de proteínas  
25 relacionadas. La familia del TGF $\beta$  está formada por 5 isoformas (Brand T. y Schneider MD (1995) *J. Mol. Cell Cardiol.* 27:5-18) de estructura dimérica (Schlunneger MP y Grutter MG (1992) *Nature* 358:430-434; Brand T. y Schneider MD (1995) *J. Mol. Cell Cardiol.* 27:5-18). Estudios de las  
30 proteínas maduras, purificadas a partir de una misma especie, han demostrado un alto grado de identidad entre sus secuencias (Tabla 1).

Tabla 1. Homología entre los diferentes tipos de TGF $\beta$ s. TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 3 procedente de humanos, TGF $\beta$ 4 procedente

- 2 -

de pollo y TGF $\beta$ 5 procedente de rana. (Roberts AB y Sporn MB, 1990).

%	de	TGF $\beta$ 1	TGF $\beta$ 2	TGF $\beta$ 3	TGF $\beta$ 4	TGF $\beta$ 5
TGF $\beta$ 1		100				
TGF $\beta$ 2		71	100			
TGF $\beta$ 3		72	76	100		
TGF $\beta$ 4		82	64	71	100	
TGF $\beta$ 5		76	66	69	72	100

5 El TGF $\beta$ 1 se sintetiza como un precursor de 390 amino-  
 ácidos denominado Pre-Pro-TGF $\beta$ 1. En una primera hidrólisis  
 se produce la liberación de un fragmento hidrófobo de 29  
 aminoácidos, que da lugar al Pro-TGF $\beta$ 1. Posteriormente se  
 libera el TGF $\beta$ 1 maduro mediante otro corte en una región  
 10 que precede al extremo amino del TGF $\beta$ 1 y que consta de dos  
 argininas, dando lugar a una proteína de 112 aminoácidos  
 con un peso molecular de 12 kDa. Para dar lugar a la forma  
 biológicamente activa, dos de estos monómeros se unen entre  
 sí por medio de puentes disulfuro, obteniéndose un dímero  
 15 de 25 kDa. Las modificaciones de esta estructura provocan  
 la pérdida de la función biológica (Barnard JA y col.  
 (1990) Biochim. Biophys. Acta 1032:79-87).

Se conoce la existencia de varios dominios dentro de  
 la estructura del TGF $\beta$ 1, uno de estos dominios se encuentra  
 20 localizado entre los aminoácidos 40 y 82 y está implicado  
 en la unión del TGF $\beta$ 1 a sus receptores celulares (Quian SW  
 y col. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. 89:6290-6294; Bur-  
 mester JK y col. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. 90:8628-  
 8632).

25

### **Receptores del TGF $\beta$ 1 y otras proteínas de unión**

• Se han caracterizado cinco tipos de receptores específicos  
 para el TGF $\beta$ 1 (Cheifetz S y col. (1988) J. Biol. Chem.

- 3 -

263:17225-17228 y López Casillas F. y col. (1991) Cell 67:785-795). Estos receptores tienen distintas afinidades para los diferentes tipos de TGF $\beta$ 1. Los receptores tipo I, II y III son los más conocidos hasta el momento (revisado en Attisano L y col (1994) Biochim. Biophys. Acta 1222:71-80; Derynck R. (1994) Trends Biochem. Sci. 19:548-553; Yingling y col. (1995) Biochim. Biophys. Acta 1242:115-136). También se han descrito los receptores de tipo IV (MacKay K. y Danielpour D. (1991) J. Biol. Chem. 266:9907-9911) y de tipo V (Ichijo H. y col. (1991) J. Biol. Chem. 266:22459-22464). Se ha descrito también que los dominios transmembrana y citoplas-máticos de la endogлина (Cheifetz S y col. (1992) J. Biol. Chem. 267:19027-19030; Bellón T. y col. (1993) Eur. J. Immunol. 23:2340-2345; Yamashita y col. (1995) J. Biol. Chem. 269:1995-2001; Zhang H. y col. (1996) J. Immunol. 156:564-573)) tiene alrededor de un 70% de analogía con los receptores de tipo III tanto humano como de rata.

El RIII sería el encargado de unir el TGF $\beta$ 1 y presentarlo a RII que a su vez formaría un complejo con RI (Yamashita y col. (1994) J. Biol. Chem. 269:20172-20178) o a complejos en los que varias moléculas de RI se asocian con el RII (Weiss G. y Massagué J. (1996) EMBO J 15:276-289). La interacción RII-RI provocaría la fosforilación de RI y la posterior activación de su serin/treonin quinasa la que fosforilaría a segundos mensajeros como las proteínas MADR2 (Macías-Silva M y col., (1996) Cell 87:1215-1224).

### **Papel del TGF $\beta$ 1 en la diferenciación y regeneración hepática**

Los efectos producidos son distintos dependiendo del momento del desarrollo y del tipo celular.

. Aumento de la matriz extracelular, al actuar sobre las células estelares hepáticas (células de Ito), principal

- 4 -

- fuelle de proteÍnas de la matriz (Mustoe TA y col. (1987) Science 237:1333-1336).
- . Diferenciación de las células epiteliales a hepatocitos (Florini JR y col. (1986) J. Biol. Chem. 261:16509-16513).
- 5 . Inhibición del crecimiento celular durante el proceso de regeneración hepática. Este efecto es de gran importancia en el mantenimiento del reposo celular *in vivo* (Kato Y y col (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:9552-9556).
- . Inhibición de la endocitosis del receptor del factor de  
10 crecimiento epitelial (EGF) como se ha podido observar en cultivos de hepatocitos fetales de rata (Noda M. y Rodan GA (1987) J. Cell Physiol. 133:426-437).

#### ***Papel del TGF $\beta$ 1 en la fibrosis hepática***

15

El TGF $\beta$ 1 se ha visto asociado a los procesos de fibrosis hepática (Czaja MJ y col. (1989) J. Cell Biol. 108:2477-2482; Annoni G. y col. (1992) J. Hepatol 14:259-264) provocando un aumento de la producción de las proteínas de la matriz extracelular, por las células estelares hepáticas (lipocitos o células de Ito), de sus receptores e inhibiendo la síntesis de las enzimas proteolíticas que degradan la matriz (Igotz RA y Massagué J. (1986) J. Biol. Chem. 261:4337-4345). En el hígado el TGF $\beta$ 1 induce la síntesis de colágeno y fibronectina en las células estelares  
20 hepáticas (Weiner FR (1990) Hepatology 11:111-117). También existe una autorregulación aumentando su propia síntesis, mediante la inducción de su ARNm.

El TGF $\beta$ 1 también se ve implicado en el aumento de la  
30 síntesis de la  $\alpha$ 2-Macroglobulina sintetizada por los hepatocitos y las células estelares hepáticas activadas. Mediante la unión al TGF $\beta$ 1 y provocando su inactivación (Bachem MG (1994) Ann NY Acad. Sci. 737:421-424) la  $\alpha$ 2-

- 5 -

Macroglobulina eliminaría el TGF $\beta$ 1 de los compartimentos extracelulares.

El estudio de pacientes afectados por un daño hepático crónico ha mostrado que existe una correlación entre la  
5 expresión del TGF $\beta$ 1 y la expresión del ARNm para el procolágeno tipo I y los niveles séricos de péptido tipo III del procolágeno (Castilla A. y col. (1991) N. Engl. J. Med. 324:933-940).

Los pacientes con cirrosis hepática tienen una expectativa de vida mas corta de lo normal debido a las complicaciones que aparecen en el curso de la enfermedad, como la hipertensión portal o la insuficiencia hepática.

#### ***Efecto del TGF $\beta$ 1 sobre la matriz extracelular***

15

La interacción del TGF $\beta$ 1 con los receptores celulares provoca:

. Activación de la síntesis de procolágeno, fibronectina (Ignatz RA y col. (1987) J. Biol. Chem. 262:6443-6446) y  
20 proteínas relacionadas, entre las que encontramos proteínas de membrana capaces de interactuar con los componentes de la matriz extracelular (Carter WG (1982) J. Biol. Chem. 257:13805-13815).

. Inhibición de la síntesis de enzimas proteolíticas capaces de degradar la matriz (Fukamizu H. y Grinnell F. (1990) Exp. Cell Res. 190:276-282).

. Estimulación de la síntesis de inhibidores de enzimas proteolíticas (Fukamizu H. y Grinnell F. (1990) Exp. Cell Res. 190:276-282).

30 Todo esto induce un aumento de las interacciones de la célula con la matriz extracelular, que junto a la mayor reorganización de las proteínas que la componen, da lugar a un aumento en la cantidad total de matriz extracelular (Roberts CJ y col. (1988) J. Biol. Chem. 263:4586-4592).

- 6 -

Estas evidencias confirman la implicación del TGF $\beta$ 1 en procesos de cicatrización (Fukamizu H. y Grinnell F. (1990) Exp. Cell Res. 190:276-282; Barnard JA y col. (1990) Biochim. Biophys. Acta 1032:79-87).

5

***Péptidos como inhibidores de la interacción ligando receptor***

Existe la posibilidad de utilizar pequeñas moléculas, péptidos sintéticos, como análogos de moléculas existentes en el organismo, con el fin de emular su función. Estudios realizados por LeSateur y col demuestran la posibilidad de usar análogos ciclados del factor de crecimiento nervioso (NGF, del inglés *Nerve Growth Factor*), emulando la región de giro  $\beta$ , permitiendo su unión al receptor (LeSateur L. y col. (1996) Nature Biotechnology 14:1120-1122). También es posible utilizar péptidos como antagonistas de estas moléculas, evitando que el factor nativo interaccione con su receptor por un bloqueo mediado por el péptido (Lasarte JJ y col. (1994) J. Acquired Immune Deficiency Syndromes 7:129-134; LeSateur y col. (1995) J. Biol. Chem. 270:6564-6569). Estudios anteriores han demostrado la utilidad de los péptidos sintéticos como inhibidores de la interacción ligando-receptor incluso en el caso de que el epitopo de reconocimiento no sea continuo (Daniels AJ y col. (1995) Mol. Pharmacol. 48:425-432). Otros estudios realizados con el receptor tipo II del TGF $\beta$ 1 y con la fetuina, una glicoproteína del grupo de receptores tipo II, han demostrado la posibilidad de usar péptidos ciclados como inhibidores de la interacción del TGF $\beta$ 1 con el RII (Demetriou M. y col. (1996) J. Biol. Chem. 271:12755-12761). Con esta ciclación se consigue obtener péptidos con una estructura similar a la que se podría dar *in vivo*.



- 7 -

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Por las razones indicadas más arriba, pensamos que péptidos procedentes tanto del TGFβ1 como de sus receptores, o de proteínas con capacidad de unión al TGFβ1, podrían ser inhibidores de la acción del TGFβ1. Por lo que decidimos explorar esta posibilidad.

***Elección de los péptidos a sintetizar***

La elección de los péptidos a sintetizar se realizó de diferente manera según provinieran del TGFβ1 o de sus receptores.

En el caso de la secuencia del TGFβ1 se sintetizaron péptidos de 15 aminoácidos que abarcaron toda la secuencia del TGFβ1. Cada péptido tenía 10 aminoácidos en común con sus dos vecinos inmediatos.

En el caso de las secuencias de sus receptores, los péptidos se eligieron en base a programas informáticos diseñados en nuestro laboratorio. Uno de estos programas permite comparar dos secuencias aminoacídicas entre sí, con el fin de predecir zonas parcialmente complementarias. También se utilizaron otros programas capaces de predecir las zonas de las proteínas que se encontrarían más expuestas, en base a la hidrofobicidad e hidrofiliidad de los aminoácidos que componen su secuencia.

***Síntesis de Péptidos***

Los péptidos se sintetizaron mediante el método de fase sólida (Merrifield (1963) J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-54), utilizando fluorenilmetiloxycarbonil (Fmoc) como grupo protector temporal del grupo alfa-amino (Atherton et al. (1989) Journal of Chemical Society Perkins Transactions 1:

- 8 -

538-546.)). Para la síntesis de pequeñas cantidades de un gran número de péptidos se utilizó un sintetizador múltiple que permite la síntesis simultánea de 96 péptidos (Borrás-Cuesta et al. (1991) *Biologicals* 19: 187-190). Los péptidos se conservaron a -80°C al estado sólido hasta su utilización.

### ***Purificación de los péptidos por HPLC***

10 Los péptidos sintetizados se analizaron y purificaron mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC), utilizando un sistema Waters 600E-900 (Millipore Corp., Bedford, Estados Unidos).

Para el análisis de los péptidos, por HPLC analítico, se utilizó una columna Waters Radial-Pak™ C<sub>18</sub> 300 Å 15 µm, 8x100mm (Millipore Corp., Bedford, Estados Unidos). El péptido se disolvió en una solución de TFA 0,1% en agua destilada, a una concentración máxima de 1 mg/ml. La solución de péptido se inyectó (100µl) en la columna y se eluyó en un gradiente de agua/acetonitrilo (Figura 15) (Romil Ltd., Cambridge, Estados Unidos) ambos con 0,1% TFA a un flujo de 1 ml/minuto. Las fracciones que contenían el péptido se detectaron por su absorbancia a 220 nm y 280 nm (photo diode array detector, waters 991, Millipore Corp., Bedford, Estados Unidos).

Para su purificación se utilizó una columna Waters Delta-Pak™ C<sub>18</sub> 300 Å 15 µm, 25x100mm (Millipore Corp., Bedford, Estados Unidos). El péptido se disolvió y se inyectó (2 ml) en las mismas condiciones que en el caso anterior, utilizándose el mismo gradiente a un flujo de 5 ml/min. La fracción que contenía el péptido puro se recogió en un matraz.

35 EXPERIMENTACIÓN IN VITRO. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LOS PÉPTIDOS

**Líneas celulares**

Se utilizó una línea procedente de epitelio de pulmón de visón, MV-1-Lu (CCL-64, American Type Cell Culture, Virginia, Estados Unidos). Las células se cultivaron en frascos de cultivo de 162 cm<sup>2</sup> (Costar Corporation, Cambridge, Estados Unidos) en una estufa a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, hasta alcanzar la subconfluencia. Se utilizó un medio completo: RPMI 1640 con L-glutamina (GibcoBRL, Life Technologies Ltd., Paisley, Escocia) suplementado con un 5% de suero de ternera fetal (FCS, Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel), HEPES 10 mM (HEPES Buffer 1M, Bio-Whittaker, Verviers, Belgica) y antibióticos (penicilina 100U/ml y estreptomicina 100 µg/ml).

**Ensayo de inhibición del crecimiento de la línea celular MV-1-Lu**

Las células Mv-1-Lu crecidas tal y como se indica más arriba, se despegaron del fondo de los frascos de cultivo utilizando 5 ml de tripsina-EDTA (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel), se resuspendieron en medio completo y se centrifugaron a 1500 r.p.m. durante 8 minutos. Tras la centrifugación las células se resuspendieron en medio completo a una concentración de 50000 células/ml. Para la realización del ensayo se tomaron 10 ml de la suspensión de células y se dispensaron a placas de 96 pocillos de fondo plano (Costar Corporation, Cambridge, Estados Unidos) añadiendo 100 µl/pocillo, y se incubaron durante toda la noche a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, lo que permite la adhesión de las células al fondo de los pocillos. Una vez transcurrido este tiempo se añadieron los péptidos a ensayar en RPMI, a una concentración final de 200 µg/ml en presencia de una concentración de 200 pg/ml de TGFβ1 en RPMI (R&D Systems Europe Ltd., Abingdon, Reino Unido). La concentra-

- 10 -

ción final de FCS en el pocillo fue del 2,5%. Tras 24 horas de incubación se añadió 1  $\mu$ Ci de timidina tritiada por pocillo ([metil- $^3$ H]-timidyne 25 Ci/mmol, Amersham Life Science, Buckinghamshire, Reino Unido) y se incubó durante 5 12 horas adicionales (Grubeck-Loebenstein B. y col. (1989) J. Clin. Invest. 83:764-770; Brennan FM y col. (1990) Clin. Exp. Immunol. 81:278-285).

Una vez terminados los periodos de incubación las células se despegaron del fondo de los pocillos con tripsina-EDTA y se recogieron utilizando un recolector manual (Titertek cell harvester, Skatron Instruments Inc., Sterling, Estados Unidos) que lisa las células recogiendo el ADN en filtros de nitrocelulosa (Filter MAT 11731, Skatron Instruments Inc., Sterling, Estados Unidos) donde 15 queda fijado. Los filtros se colocaron individualmente en tubos de polipropileno de 5 ml a los que se añadió 4 ml de líquido de centelleo (Biogreen-11, Reactivos Scharlau S.A., Barcelona, España). La actividad de cada tubo se cuantificó durante 90 segundos en un contador de centelleo  $\beta$  LKB (Beta plate system, LKB, Upssala, Suiza). 20

**Estudio de la inhibición de la unión del TGF $\beta$ 1 a los receptores celulares**

**Marcaje selectivo de los receptores celulares (Affinity labeling)** 25

Las células MV-1-Lu se despegaron de los frascos de cultivo incubándolas a 37°C durante 10 minutos, con 10 ml de la solución 1 (NaCl 128 mM, KCl 5 mM, 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfonato 25 mM a pH 7,5, glucosa 5 mM y EDTA 1 mM). Las células así despegadas se resuspendieron en la solución 2 (NaCl 128 mM, KCl 5 mM, 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfonato 50 mM a pH 7,5, CaCl<sub>2</sub> 1,2 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM y 5 mg/ml BSA) y se recogieron por centrifugación a 35 1000 x g. durante 5 minutos. Tras la centrifugación las cé-

- 11 -

lulas se resuspendieron en la solución 2 a una concentración de  $10^6$  células/ml.

A partir de esta suspensión celular se hicieron alícuotas de 0,5 ml en placas de 24 pocillos (*Greiner GmbH, Frickenhausen, Alemania*) donde se añadieron los péptidos, en 50  $\mu$ l de una solución 0,8 mg/ml, se incubaron durante 2 horas a 4°C en agitación. Posteriormente se añadió  $^{125}\text{I}$ -TGF $\beta$ 1 (2 $\mu$ Ci) a una concentración final de 277,2 pM ( $^{125}\text{I}$ -TGF $\beta$ 1 human recombinant 800-2200Ci/mmol, *Amersham Life Science, Buckinghamshire, Reino Unido*) y se incubó durante otras dos horas a 4°C en agitación.

Tras la incubación, las células se transfirieron a un tubo de centrífuga donde se centrifugaron en frío a 12000 x g. durante 1 minuto. Posteriormente se lavaron 2 veces en solución 2 fría y se resuspendieron en 0,5 ml de solución 2 fría, 5  $\mu$ l de dimetil sulfóxido (DMSO 99,5%, *Sigma Chemical Co., St. Louis, Estados Unidos*) y disuccimidil suberato (DSS, *Pierce Chemical Co., Rockford, Estados Unidos*) dando una concentración final 0,25 mM de DSS. La reacción se detuvo a los 15 minutos por dilución, centrifugación y lavado con una solución que contiene sacarosa 0,25M, Tris 10 mM y EDTA 1 mM a pH 7,4. El precipitado de células se resuspendió en 0,5 ml de Tritón x-100 (*Bio-Rad Laboratories, Hercules, Estados Unidos*) 1% v/v, Tris 10 mM a pH 7,0, EDTA 1 mM, Fenilmetilsulfonil fluoruro 0,1mM, Pepsatin 1 $\mu$ g/ml y Leupeptin 1 $\mu$ g/ml (*Sigma Chemical Co., St. Louis, Estados Unidos*) y se incubó durante 40 minutos a 4°C. La fracción insoluble en detergente se separa por centrifugación a 12000 x g. durante 15 minutos. Las fracciones solubles en detergente (sobrenadante) e insoluble (precipitado) se congelaron a -20°C (Massagué J. y Like B. (1985) *J. Biol. Chem.* 260:2636-2645).

**Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato-sódico**

- 12 -

Las fracciones soluble e insoluble en detergente se utilizaron para análisis electroforéticos en geles de acrilamida/bisacrilamida al 7,5% durante 5-6 horas a 220  
5 voltios.

La tinción de las proteínas se realizó con una solución de *comassie brilliant blue*<sup>®</sup> R250 (Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg, Alemania) en metanol 50%, ácido acético 10% y agua destilada, durante 30 minutos. Los lavados  
10 posteriores se realizaron con una solución de metanol 50%, ácido acético 10% y agua destilada durante 15 minutos, en un primer lavado y metanol 2,5%, ácido acético 0,5% y agua destilada, en los siguientes lavados, hasta la eliminación del color de fondo.

15

#### ***Citometría de flujo***

La inhibición de la unión del TGF $\beta$ 1, mediada por los péptidos, a los receptores celulares se midió mediante el  
20 método de inmunofluorescencia directa. Para ello se utilizó un Kit de inmunofluorescencia (*Fluorokine rh TGF $\beta$ -biotin, R&D Systems Europe Ltd., Abingdon Reino Unido*). Este ensayo está basado en la capacidad de unión del TGF $\beta$ 1 biotinilado a los receptores celulares, de forma específica y la poste-  
25 rior interacción de la biotina con avidina fluoresceinada; de tal forma que la intensidad de la señal dependerá de la cantidad de TGF $\beta$ 1 unido a los receptores celulares.

Las células MV-1-Lu crecidas en frascos de 162 cm<sup>2</sup> se despegaron utilizando la solución 1 (descrita anteriormen-  
30 te) y se resuspendieron en suero fisiológico para su centrifugación a 500 x g. durante 5 minutos. Tras la centrifugación las células se resuspendieron de nuevo en suero fisiológico a una concentración de 4x10<sup>6</sup> células/ml. Se añadieron 25  $\mu$ l de la suspensión celular a tubos de boro-  
35 silicato de 12x75 mm a los que se añadió el péptido a

- 13 -

ensayar en 40  $\mu$ l de medio RPMI 1640, dando una concentración final de 0,42  $\mu$ g/ $\mu$ l y 10  $\mu$ l de TGF $\beta$ 1 biotinilado. Como control de la especificidad se añadió 10  $\mu$ l de un reactivo biotinilado suministrado por el Kit, como control positivo se añadió 10  $\mu$ l de TGF $\beta$ 1 biotinilado y como control negativo se añadió 20  $\mu$ l de un anticuerpo bloqueante anti-TGF $\beta$ 1. En todos los controles se añadió suero fisiológico hasta alcanzar un volumen total de 75  $\mu$ l. Todos los tubos se incubaron durante una hora a 4°C en oscuridad.

Transcurrido el periodo de incubación se añadió 10  $\mu$ l de avidina fluoresceinada y se incubó durante 30 minutos a 4°C en oscuridad, tras los que se añadió 2 ml de una solución de lavado (RDF1) y se centrifugó a 500 x g durante 6 minutos. El precipitado celular se resuspendió en 0,2 ml de PBS frío para el análisis citométrico (FACScan, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, California, Estados Unidos). Este procedimiento permite medir la fluorescencia emitida por cada célula al incidir sobre ella un haz de láser mediante un programa informático (Lisys<sup>II</sup>, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, California, Estados Unidos). En la Figura 16 se muestra una imagen típica del análisis por citometría de flujo.

Para la obtención de los datos de inhibición de la unión del TGF $\beta$ 1 a los receptores se utilizó el control positivo del ensayo para delimitar los campos correspondientes a las células marcadas, que han unido al TGF $\beta$ 1-biotina, (M2) y a las células no marcadas (M1). Una vez delimitados los campos se calculó el porcentaje de células que se encontraba dentro de cada uno. Se hizo lo mismo con los datos obtenidos cuando se incubaba el péptido con TGF $\beta$ 1-biotina o con las células, según fueran procedentes de los receptores o del TGF $\beta$ 1 respectivamente. Con estos datos se calculó el porcentaje de inhibición de cada péptido utilizando la siguiente fórmula:  $100 - ((M2 \text{ Péptido} - M2 \text{ Negativo}) \times 100 / (M2$

- 14 -

Positivo-M2 Negativo)).

#### EXPERIMENTACIÓN IN VIVO. MODELO DE FIBROSIS EXPERIMENTAL

5        Se utilizaron ratas blancas macho (raza Wistar albina), procedentes de camadas simultáneas (5 semanas  $\pm$  1,5 semanas), con el fin de obtener un grupo homogéneo en edad, y peso inicial. A lo largo del periodo de experimentación, los animales fueron mantenidos en condiciones de temperatura constante (22°C) y con un ciclo luz/oscuridad de 12  
10        horas. Tuvieron libre acceso al agua y a la comida.

      Se indujo cirrosis hepática (CH) mediante inhalación de tetracloruro de carbono, durante 11 semanas, dos veces por semana (López Novoa JM y col (1976) Patología IX:223-  
15        240; Camps J. y col. (1987) Gastroenterology 93:498-505). La exposición al CCl<sub>4</sub> se efectuó haciendo burbujear aire comprimido, a un flujo de 3 litros/minuto, a través de un frasco lavador de gases. Se comenzó con un minuto de exposición, aumentando en un minuto por semana hasta llegar a 4  
20        minutos en la cuarta semana. Durante la quinta semana no se administró CCl<sub>4</sub>, comenzando de nuevo a la sexta semana con una exposición de 5 minutos. Este tiempo de exposición se mantuvo hasta la semana 11. En el agua de bebida se añadió 400 mg/l de fenobarbital (*Luminal*®, Bayer, Leverkusen, Ale-  
25        mania), desde una semana antes de iniciar la exposición al CCl<sub>4</sub> y hasta el final del periodo de experimentación. Antes de iniciar el tratamiento se dejó una semana, en la que no se les administró CCl<sub>4</sub>. Durante el tratamiento se les administró una dosis semanal de CCl<sub>4</sub>, como recuerdo (Figura 2).

30

#### ***Distribución de los animales***

      Los animales se distribuyeron en 4 grupos antes de iniciarse el proceso de inducción de la cirrosis hepática.

35



- 15 -

*Controles Sanos (Co)*: Animales que no fueron sometidos al proceso de fibrosis.

5     *Controles Sanos tratados (Co+P144)*: Animales que no fueron sometidos al proceso de fibrosis y se les administró el péptido P144 durante las 3 últimas semanas (coincidiendo en el tiempo con el tratamiento del grupo de ratas Tto<sub>2</sub>).

10    *Controles Cirróticos 1 (Ci<sub>1</sub>)*: Animales sometidos al proceso de inducción de cirrosis por inhalación de CCl<sub>4</sub> dos veces por semana. Estos animales se separaron en 2 grupos al llegar a la quinta semana:

15       Controles cirróticos 1 (Ci<sub>1</sub>): Animales que siguieron sometidos al proceso de inducción de la fibrosis hasta la semana 11, sin administrarles el péptido P144. Se les administró suero salino en días alternos, durante todo el proceso de inducción (semanas 5 a 11).

20       Cirróticos Tratados 1 (Tto<sub>1</sub>): Animales a los que se le administró el péptido P144 procedente de la secuencia del receptor tipo III, en días alternos, durante el proceso de inducción de la fibrosis, desde la semana 5 hasta la semana 11.

25       *Controles Cirróticos 2 (Ci<sub>2</sub>)*: Animales que siguieron sometidos al proceso de inducción de la fibrosis sin recibir el péptido P144 ni suero salino. Este grupo se subdividió en otros dos al llegar a la semana 11.

30       Controles Cirróticos 2 (Ci<sub>2</sub>): Animales cirróticos que no fueron sometidos a ningún tipo de tratamiento, manteniéndose como controles. Estos animales recibieron inyecciones de suero salino durante 3 semanas (semanas 35     13 a 15).

Cirróticos Tratados 2 (Tto<sub>2</sub>): Animales cirróticos que fueron tratados con el péptido procedente de la secuencia del receptor tipo III (P144), durante 3 semanas (semanas 13 a 15).

#### ***Tratamiento de los animales***

. Grupo Tto<sub>1</sub>: Estos animales fueron sometidos a tratamiento durante el proceso de fibrosis. El tratamiento con el péptido se inició en la quinta semana, (antes de la exposición al CCl<sub>4</sub> durante 5 minutos) y se continuó hasta finalizar las once semanas del proceso de inducción de cirrosis.

15 . Grupo Tto<sub>2</sub>: Estos animales fueron sometidos a tratamiento después de finalizado el proceso de inducción de cirrosis (11 semanas). El tratamiento se inició una semana después de la última inhalación de CCl<sub>4</sub> y se continuó durante 21 días.

20 Antes de iniciar el tratamiento y al finalizarlo se extrajo sangre a todos los animales sometidos al tratamiento con el péptido. El péptido fue administrado por inyección subcutánea, en la zona abdominal a una dosis de 70 µg/animal en 500 µl de suero fisiológico.

25

#### ***Sacrificio de los animales y disección del hígado***

Finalizado el tratamiento de los animales con el péptido, tanto en el modelo con ratas como en el de ratones, se sacrificaron por decapitación, después de haberles extraído sangre del plexo retroorbital con un capilar.

Inmediatamente después se procedió a la disección del hígado y la recogida de muestras.

35 Se cortaron las muestras y se introdujeron en formol como solución fijadora, para su posterior análisis histoló-

- 17 -

gico. Otros fragmentos se introdujeron en criotubos, que tras la inmersión en nitrógeno líquido se conservaron a -80°C.

## 5 ***Evaluación anatomopatológica del hígado***

El estudio histológico se realizó en fragmentos de hígado previamente fijados en formol durante al menos 24 horas, transcurridas las cuales se introdujeron en etanol (70%).

Tras la deshidratación se procedió a la inclusión en bloques de parafina. De los bloques obtenidos se realizaron cortes seriados de 3 µm de espesor, empleando un microtomo de rotación Leitz y cuchillas de acero. Previamente a la tinción los cortes se desparafinaron en xilol (*AnalaR*, *BDH*, *Poole*, *Reino Unido*) durante 15 minutos, después de calentarlos a 60°C en una estufa, durante 15 minutos, y se hidrataron mediante pasos sucesivos por alcoholes de concentración decreciente 100%, 96%, 80% y 70% finalizando en agua. Se realizaron las siguientes tinciones:

Hematoxilina-Eosina.

Tricrómico de Masson (Locquin M, y Langeron, (1985) en *Manual de Microscopía* Ed. Labor S.A Barcelona): Utiliza un colorante específico para proteínas colagénicas (verde luz).

Rojo Sirio: Tinción específica para colágeno.

### ***Confirmación de la fibrosis hepática: análisis de imagen***

Para el análisis de imagen de las muestras obtenidas se utilizó un microscopio de luz (*Olympus BH-2*, *Tokio*, *Japón*) conectado a una cámara de vídeo (*Sony DXP-950P*, *Sony Co.*, *Tokio*, *Japón*), con la que se captaron los diferentes campos de cada preparación. Se tomaron 6 campos de manera aleatoria a partir de cada preparación teñida con rojo

- 18 -

sirio. Las diferentes imágenes captadas se analizaron por medio de un programa informático (*Visilog 4.1.5, Noesis, Orsay, Francia*) capaz de calcular el área de fibrosis y el área total de la preparación. Con estos datos se calculó un índice de fibrosis (área de fibrosis/área total) de cada campo. Para poder utilizar este programa se necesitó modificar la adquisición de las imágenes mediante la utilización de filtros de luz polarizada (*Olympus U-POT, Tokio, Japón*) y de luz verde (*Olympus IF550, Tokio, Japón*) lo que permitió la automatización del proceso de análisis de las muestras.

***Detección de colágeno en cortes de 14 µm de tejido parafinado***

15

Los cortes de 14 µm que se utilizaron para esta técnica se obtuvieron de la misma manera que los cortes de 3 µm anteriormente mencionados. Estos cortes fueron sometidos a un proceso de desparafinización durante 12 horas en xilol. Una vez eliminada la parafina, las muestras fueron hidratadas pasándolas por diferentes grados de alcohol 96%, 80%, 50%, finalizando el proceso en agua destilada.

Una vez hidratadas se sometieron a un proceso de pre-tinción en una solución de 160 mg de *Fast Green FCF* (*Fluka chemika-BioChemika, Buchs, Suiza*) en 160 ml de ácido pícrico (*Merk, Darmstadt, Alemania*) saturado durante 15 minutos en oscuridad. Las muestras se lavaron por inmersión en agua hasta que dejaron de colorear el agua de lavado. Una vez eliminado el colorante sobrante, las muestras se tiñeron durante 30 minutos en oscuridad en una solución de 160 mg de *Direct Red 80*, (*Fluka Chemika-BioChemika Buchs, Suiza*) y 64 mg de *Fast Green*, ambos colorantes en 160 ml de ácido pícrico saturado. Se lavaron de nuevo hasta eliminar el colorante sobrante y se procedió a despegar las muestras de los portas mediante el raspado de la muestra con una

- 19 -

espátula pequeña. Los cortes así despegados se introdujeron en diferentes tubos que contenían 3 ml de una solución de NaOH 0,1 N (*Quimón, Montplet&Esteban S.A., Barcelona, España*) y Metanol (1:1). Se tomaron alícuotas de los diferentes  
5 tubos para su lectura en el espectrofotómetro (*Lambda 2 UV/VIS spectrophotometer, Perkin-Elmer, Norwalk, Estados Unidos*) a longitudes de onda de 540 nm y 630 nm utilizándose como blanco una alícuota de la solución de NaOH 0,1 N y Metanol (López de León A. y Rojkind (1985) *Histochem*  
10 *Cytochem* 33:737-743; Gaudio E. y col. (1993) *Int. J. Exp. Path.* 74:463-469).

De acuerdo a los trabajos de Gaudio E. y col. (1993) *Int. J. Exp. Path.* 74:463-469) se utilizaron las siguientes fórmulas para la obtención de las cantidades de colágeno y  
15 de proteína total:

$$\text{mg Colágeno} = \frac{\text{absorbancia a 540 nm} - \text{absorbancia a 630 nm}}{37}$$

$$\text{mg Colágeno/mg proteína total} = \frac{\text{mg Colágeno}}{\text{mg Colágeno} + \text{mg proteínas no colagénicas}}$$

20

$$\text{Proteínas no colagénicas} = \frac{\text{absorbancia a 630 nm}}{3}$$

## 25 **Tratamiento estadístico de los resultados**

Los datos obtenidos en la experimentación *in vivo* se sometieron a análisis estadístico. La normalidad de las variables cuantitativas se comprobó mediante el ensayo de  
30 Shapiro-Wilks.

Debido a que los datos no se ajustaban a una distribución normal se realizó estadística no paramétrica. La comparación entre grupos se hizo mediante la H de Kruskal-Wallis seguida de la comparación de U de Mann-Whitney. Los

- 20 -

datos se graficaron mediante cajas representándose la mediana de los datos, línea gruesa dentro de cada caja, junto con el rango intercuartílico, altura de la caja, mientras que los bigotes de cada caja representan las observaciones más altas y más bajas dentro de un determinado rango intercuartílico.

La asociación entre variables se estudió mediante la prueba exacta de Fisher. Se realizó una regresión logística para estudiar la independencia de la asociación de estas variables.

Se consideró significativo el valor de P igual o menor de 0,05.

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa SPSS para Windows V 6.1.3.

15

#### INHIBICIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD DEL TGF $\beta$ 1

##### ***Ensayo de inhibición del crecimiento celular de la línea MV-1-Lu***

20

El TGF $\beta$ 1 es una citoquina capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* de la línea celular MV-1-Lu (Grubeck-Loebenstein B. y col. (1989) J. Clin. Invest. 83:764-770; Brennan FM y col. (1990) Clin. Exp. Immunol. 81:278-285), por lo que esta línea se utilizó para ensayar el efecto bloqueante de los péptidos sobre el TGF $\beta$ 1. Tras diferentes combinaciones de medios, células y timidina se estudió el efecto de distintas concentraciones de TGF $\beta$ 1 sobre la incorporación de [metil- $^3$ H] timidina, por parte de las células MV-1-Lu en cultivo, hasta determinar las condiciones más adecuadas para el ensayo. Estas condiciones se muestran en la Figura 3.

30

Una vez determinadas tanto la concentración óptima de células MV-1-Lu (5000 células/pocillo) como la menor con-

- 21 -

centración de TGF $\beta$ 1 capaz de producir una inhibición de alrededor del 90% (200 pg/ml, Figura 18) se ensayó el efecto inhibitorio de los péptidos sintéticos a la concentración de 200  $\mu$ g/ml.

5

***Inhibición in vitro de la actividad del TGF $\beta$ 1 mediante péptidos sintéticos***

Los péptidos sintéticos potencialmente inhibidores de la actividad del TGF $\beta$ 1, elegidos tal como se indica más arriba en la sección: elección de los péptidos a sintetizar (tanto los procedentes de proteínas que se unen al TGF $\beta$ 1 como del propio TGF $\beta$ 1) se ensayaron utilizando la línea celular MV-1-Lu. Los péptidos se disolvieron en medio RPMI tamponado, libre de suero de ternera fetal y se procedió como sigue:

Los péptidos pertenecientes a la secuencia del receptor, o complementarios a los picos de hidrofiliidad del TGF $\beta$ 1, se incubaron durante 30 minutos en presencia de esta citoquina y luego se agregaron al cultivo celular. Los péptidos procedentes de la secuencia del TGF $\beta$ 1 se añadieron al cultivo celular antes de la adición del TGF $\beta$ 1, para que interaccionaran con los receptores de la superficie celular. Estas incubaciones se realizaron en 100  $\mu$ l del mismo medio que el utilizado para añadir las células. Los péptidos activos permitieron el crecimiento celular en mayor o menor grado según fuera su capacidad de inhibir al TGF $\beta$ 1.

***Inhibición del TGF $\beta$ 1 mediante péptidos procedentes del TGF $\beta$ 1***

30

En una primera etapa se sintetizaron péptidos solapados procedentes del TGF $\beta$ 1. Estos péptidos (Tabla 2) se sintetizaron pensando que alguno de ellos podría unirse a

- 22 -

los receptores celulares, impidiendo de esta manera la unión del TGF $\beta$ 1 natural a estos receptores.

Tabla 2. Péptidos procedentes del TGF $\beta$ 1. Se indica el número del péptido junto a su posición en la secuencia completa, así como su secuencia de aminoácidos. Por comodidad de síntesis todos los péptidos se sintetizaron con una alanina añadida en el extremo C-terminal que no se indica en la tabla.

10

<u>Péptido</u>	<u>Secuencia</u>
P1 <sub>(280-293)</sub>	AlaLeuAspThrAsnTyrCysPheSerSerThrGluLysAsn
P2 <sub>(284-297)</sub>	AsnTyrCysSerSerThrGluLysAsnCysCysValArg
P3 <sub>(288-301)</sub>	SerSerThrGluLysAsnCysCysValArgGlnLeuTyrIle
P4 <sub>(294-307)</sub>	CysCysValArgGlnLeuTyrIleAspPheArgLysAspLeu
P5 <sub>(298-311)</sub>	GlnLeuTyrIleAspPheArgLysAspLeuGlyTrpLysTrp
P6 <sub>(302-315)</sub>	AspPheArgLysAspLeuGlyTrpLysTrpIleHisGluPro
P7 <sub>(306-319)</sub>	AspLeuGlyTrpLysTrpIleHisGluProLysGlyTyrHis
P8 <sub>(308-321)</sub>	GlyTrpLysTrpIleHisGluProLysGlyTyrHisAlaAsn
P9 <sub>(312-325)</sub>	IleHisGluProLysGlyTyrHisAlaAsnPheCysLeuGly
P10 <sub>(316-329)</sub>	LysGlyTyrHisAlaAsnPheCysLeuGlyProCysProTyr
P11 <sub>(319-333)</sub>	HisAlaAsnPheCysLeuGlyProCysProTyrIleTrpSerLeu
P12 <sub>(322-335)</sub>	PheCysLeuGlyProCysProTyrIleTrpSerLeuAspThr
P13 <sub>(326-339)</sub>	ProCysProTyrIleTrpSerLeuAspThrGlnTyrSerLys
P14 <sub>(330-343)</sub>	IleTrpSerLeuAspThrGlnTyrSerLysValLeuAlaLeu
P15 <sub>(335-349)</sub>	ThrGlnTyrSerLysValLeuAlaLeuTyrAsnGlnHisAsnPro
P16 <sub>(336-349)</sub>	GlnTyrSerLysValLeuAlaLeuTyrAsnGlnHisAsnPro
P17 <sub>(340-353)</sub>	ValLeuAlaLeuTyrAsnGlnHisAsnProGlyAlaSerAla
P18 <sub>(343-358)</sub>	LeuTyrAsnGlnHisAsnProGlyAlaSerAlaAlaProCysCys
P19 <sub>(344-358)</sub>	TyrAsnGlnHisAsnProGlyAlaSerAlaAlaProCysCys
P20 <sub>(348-360)</sub>	AsnProGlyAlaSerAlaAlaProCysCysValProGln
P21 <sub>(350-363)</sub>	GlyAlaSerAlaAlaProCysCysValProGlnAlaLeuGlu
P22 <sub>(354-367)</sub>	AlaProCysCysValProGlnAlaLeuGluProLeuProIle
P23 <sub>(358-371)</sub>	ValProGlnAlaLeuGluProLeuProIleValTyrTyrVal
P24 <sub>(364-377)</sub>	ProLeuProIleValTyrTyrValGlyArgLysProLysVal



- 23 -

P25<sub>(368-381)</sub> ValTyrTyrValGlyArgLysProLysValGluGlnLeuSer  
P26<sub>(372-385)</sub> GlyArgLysProLysValGluGlnLeuSerAsnMetIleVal  
P27<sub>(378-391)</sub> GluGlnLeuSerAsnMetIleValArgSerCysLysCysSer

En la Figura 4 se muestra el efecto inhibitorio de los péptidos de la Tabla 6 sobre la actividad del TGFβ1. Puesto que el TGFβ1 inhibe el crecimiento de las células MV-1-Lu, la inhibición de esta citoquina mediante los péptidos conlleva el restablecimiento del crecimiento de las células MV-1-Lu.

Como se puede observar en la Figura 4 el péptido P12, procedente de la secuencia del TGFβ1, es el que presenta una mayor actividad inhibitoria del TGFβ1. Con el fin de estudiar con más detalle el efecto inhibitorio del péptido P12 se realizó un estudio del efecto de la concentración del péptido sobre la inhibición de la citoquina, el cual se indica a continuación.

15

***Ensayo dosis-respuesta de la inhibición del TGFβ1 por el péptido P12***

Se estudió el efecto de la concentración del péptido P12 sobre la inhibición de la actividad del TGFβ1. Debido a que este péptido no fue fácilmente soluble en el medio de ensayo, se prepararon soluciones o suspensiones madre de concentración nominal de péptido (aquella que se hubiera logrado si el péptido se hubiera disuelto completamente) y a partir de ellas se tomaron alícuotas que se filtraron o bien se usaron directamente para los ensayos de inhibición.

En la Figura 5 se estudia el efecto inhibidor de concentraciones nominales de péptido, antes y después de filtrar. Se observa que el péptido P12 filtrado y sin filtrar tiene prácticamente la misma actividad.

- 24 -

Una vez obtenidos los resultados con el péptido P12 se decidió alargar el péptido tanto, en el sentido N-terminal como C-terminal y estudiar el efecto sobre su actividad. Además se hicieron modificaciones en su secuencia para mejorar su solubilidad y estudiar la importancia de las dos Cisteínas de su secuencia sobre la actividad inhibitoria del TGF $\beta$ 1. Los péptidos sintetizados se indican en la Tabla 3.

10 Tabla 3. Péptidos procedentes de la modificación del péptido P12.

	<u>Péptido</u>	<u>Secuencia</u>
15	P12 <sub>(322-335)</sub>	PheCysLeuGlyProCysProTyrIleTrpSerLeuAspThr
	P28 <sub>(322-344)</sub>	PheCysLeuGlyProCysProTyrIleTrpSerLeuAspThrGlnLysVal LeuAlaLeuTyr
20	P29 <sub>(313-335)</sub>	HisGluProLysGlyTyrHisAlaAsnPheCysLeuGlyProCysProTyr IleTrpSerLeuAspThr
	P30	PheSerLeuGlyProCysProTyrIleTrpSerLeuAspThr
	P31	PheCysLeuGlyProSerProTyrIleTrpSerLeuAspThr
	P32	PheSerLeuGlyProSerProTyrIleTrpSerLeuAspThr
	P33	PheCysLeuGlyProCysProTyrIleTrpSerAspAspAsp
25	P34	AspAspAspGlyProCysProTyrIleTrpSerLeuAspThr
	P35	AspAspAspGlyProCysProTyrIleTrpSerAspAspAsp
	P36	GlyProCysProTyrIleTrpSerAspAspAsp
	P37	AspAspAspGlyProCysProTyrIleTrpSer
	P38	AspGlyProCysProTyrIleTrpSerAsp

30 En la Figura 6 se muestran los resultados de la inhibición del TGF $\beta$ 1 por parte de los péptidos de la Tabla 3.

En la Figura 6 se observa que el péptido P29 es activo. Este péptido engloba al péptido P12 probado anteriormente y tiene 9 aminoácidos mas hacia el extremo N-terminal (Figura 4). Estudios realizados por Quian SW y col. (1992)

- 25 -

Proc. Natl. Acad. Sci. 89:6290-6294) y por Burmester JK y  
cól. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. 90:8628-8632) mediante  
la utilización de proteínas quiméricas recombinantes iden-  
tificaron una región del TGF $\beta$ 1 necesaria para la actividad  
5 de esta citoquina (aminoácidos 40 a 82, en la secuencia del  
TGF $\beta$ 1 maduro). Se especuló que el péptido P29 (aminoácidos  
34 a 56, en la secuencia del TGF $\beta$ 1 maduro) al abarcar una  
zona mayor que el péptido P12 (aminoácidos 43 a 56), podría  
adquirir una estructura tridimensional más semejante a la  
10 estructura del TGF $\beta$ 1 en circulación. Por este motivo se  
utilizó el péptido P29 para ensayos de unión a los recepto-  
res celulares, basados en el marcaje por afinidad.

***Ensayos de inhibición de la unión del TGF $\beta$ 1 a sus  
15 receptores por el péptido P29 (marcaje por afinidad)***

El péptido P29 procedente de la secuencia del TGF $\beta$ 1,  
se utilizó en los ensayos de marcaje por afinidad para  
comprobar su capacidad de inhibición de la unión del TGF $\beta$ 1  
20 a sus receptores celulares (Material y Métodos).

Debido a la diferente actividad de los lotes de  $^{125}\text{I}$ -  
TGF $\beta$ 1 empleados, las concentraciones de péptido utilizadas  
en los ensayos se ajustaron en función de la concentración  
del lote  $^{125}\text{I}$ -TGF $\beta$ 1 utilizado en cada caso. Los resultados de  
25 estos ensayos se muestran en las Figuras 7 y 8.

Se realizaron ensayos posteriores para buscar la con-  
centración mínima necesaria para bloquear la unión del  $^{125}\text{I}$ -  
TGF $\beta$ 1 a los receptores celulares.

***30 Inhibición del TGF $\beta$ 1 mediante péptidos procedentes de la  
secuencia del receptor de tipo III de rata***

Con el propósito de encontrar nuevos péptidos inhibi-  
dores de la actividad del TGF $\beta$ 1 se sintetizaron péptidos

- 26 -

procedentes del receptor tipo III de rata. Algunos péptidos se eligieron en base a zonas de su secuencia que fueron predichas como complementarias a bloques de aminoácidos de la secuencia del TGF $\beta$ 1. Se esperaba que estos péptidos fueran capaces de unirse al TGF $\beta$ 1 libre, secuestrándolo e impidiendo su unión a los receptores celulares.

Otros péptidos se sintetizaron solapando 10 aminoácidos y cubriendo parte de la zona extracelular del receptor de tipo III (aminoácidos 45 a 410). Se ha descrito que existe un receptor tipo III soluble que se corresponde con la zona extracelular del receptor, esta zona se corta de la membrana y actúa como un secuestrador del TGF $\beta$ 1 en circulación (López Casillas F. y col. (1991) Cell 67:785-795). Estudios posteriores han descrito dos posibles zonas de unión al TGF $\beta$ 1, una de ellas se encuentra en el extremo N-terminal del receptor (López-Casillas y col. (1994) J. Cell Biol. 124:557-568) y la otra se encuentra en la zona más próxima a la membrana, hacia el extremo C-terminal (Fukushima D. y col. (1993) J. Biol. Chem. 268:22710-22715; Pepin MC y col. (1995) FEBS Lett 377:368-372). Por estos motivos se sintetizaron péptidos de la zona extracelular de este receptor suponiendo que estos péptidos podrían ser capaces de secuestrar el TGF $\beta$ 1 circulante.

En la Tabla 4 se muestran los péptidos sintetizados.

25

Tabla 4. Péptidos procedentes del receptor tipo III de rata. Se indica el número del péptido y su secuencia. P39 a P65 son péptidos predichos como complementarios al TGF $\beta$ 1 y P66 a P138 son péptidos solapados que cubren la región extracelular del receptor. Por comodidad de síntesis todos los péptidos se sintetizaron con una alanina añadida en el extremo C-terminal que no se indica en la tabla.

30

<u>Péptido</u>	<u>Secuencia</u>
P39 <sub>(91-102)</sub>	AsnProIleAlaSerValHisThrHisHisLysPro
P40 <sub>(104-115)</sub>	ValPheLeuLeuAsnSerProGlnProLeuValTrp
P41 <sub>(109-120)</sub>	SerProGlnProLeuValTrpHisLeuLysThrGlu
P42 <sub>(110-121)</sub>	ProGlnProLeuValTrpHisLeuLysThrGluArg
P43 <sub>(333-344)</sub>	TrpAlaLeuAspAsnGlyTyrArgProValThrSer
P44 <sub>(428-439)</sub>	ProIleValProSerValGlnLeuLeuProAspHis
P45 <sub>(555-566)</sub>	GlyAspGluGlyGluThrAlaProLeuSerArgAla
P46 <sub>(563-574)</sub>	LeuSerArgAlaGlyValValValPheAsnCysSer
P47 <sub>(603-614)</sub>	LeuPheLeuValProSerProGlyValPheSerVal
P48 <sub>(605-616)</sub>	LeuValProSerProGlyValPheSerValAlaGlu
P49 <sub>(707-718)</sub>	GluLeuThrLeuCysSerArgLysLysGlySerLeu
P50 <sub>(712-723)</sub>	SerArgLysLysGlySerLeuLysLeuProArgCys
P51 <sub>(717-728)</sub>	SerLeuLysLeuProArgCysValThrProAspAsp
P52 <sub>(722-733)</sub>	ArgCysValThrProAspAspAlaCysThrSerLeu
P53 <sub>(727-738)</sub>	AspAspAlaCysThrSerLeuAspAlaThrMetIle
P54 <sub>(731-742)</sub>	ThrSerLeuAspAlaThrMetIleTrpThrMetMet
P55 <sub>(732-743)</sub>	SerLeuAspAlaThrMetIleTrpThrMetMetGln
P56 <sub>(737-748)</sub>	MetIleTrpThrMetMetGlnAsnLysLysThrPhe
P57 <sub>(742-753)</sub>	MetGlnAsnLysLysThrPheThrLysProLeuAla
P58 <sub>(747-758)</sub>	ThrPheThrLysProLeuAlaValValLeuGlnVal
P59 <sub>(761-775)</sub>	LysGluAsnValProSerThrLysAspSerSerProIleProPro
P60 <sub>(766-780)</sub>	SerThrLysAspSerSerProIleProProProProGlnIle
P61 <sub>(771-785)</sub>	SerProIleProProProProGlnIlePheHisGlyLeuAsp
P62 <sub>(776-790)</sub>	ProProProGlnIlePheHisGlyLeuAspThrLeuThrValMet
P63 <sub>(781-795)</sub>	PheHisGlyLeuAspThrLeuThrValMetGlyIleAlaPheAla
P64 <sub>(786-800)</sub>	ThrLeuThrValMetGlyIleAlaPheAlaAlaPheValIleGly
P65 <sub>(797-809)</sub>	LeuLeuThrGlyAlaLeuTrpTyrIleTyrSerHis
P66 <sub>(45-59)</sub>	LeuMetGluSerPheThrValLeuSerGlyCysAlaSerArgGly
P67 <sub>(50-64)</sub>	ThrValLeuSerGlyCysAlaSerArgGlyThrThrGlyLeuPro
P68 <sub>(55-69)</sub>	CysAlaSerArgGlyThrThrGlyLeuProArgGluValHisVal
P69 <sub>(60-74)</sub>	ThrThrGlyLeuProArgGluValHisValLeuAsnLeuArgSer
P70 <sub>(65-79)</sub>	ArgGluValHisValLeuAsnLeuArgSerThrAspGlnGlyPro
P71 <sub>(70-84)</sub>	LeuAsnLeuArgSerThrAspGlnGlyProGlyGlnArgGlnArg
P72 <sub>(75-89)</sub>	ThrAspGlnGlyProGlyGlnArgGlnArgGluValThrLeuHis
P73 <sub>(80-94)</sub>	GlyGlnArgGlnArgGluValThrLeuHisLeuAsnProIleAla

- 28 -

P74<sub>(85-99)</sub> GluValThrLeuHisLeuAsnProIleAlaSerValHisThrHis  
 P75<sub>(90-104)</sub> LeuAsnProIleAlaSerValHisThrHisHisLysProIleVal  
 P76<sub>(95-109)</sub> SerValHisThrHisHisLysProIleValPheLeuLeuAsnSer  
 P77<sub>(100-114)</sub> HisLysProIleValPheLeuLeuAsnSerProGlnProLeuVal  
 P78<sub>(105-119)</sub> PheLeuLeuAsnSerProGlnProLeuValTrpHisLeuLysThr  
 P79<sub>(110-124)</sub> ProGlnProLeuValTrpHisLeuLysThrGluArgLeuAlaAla  
 P80<sub>(115-129)</sub> TrpHisLeuLysThrGluArgLeuAlaAlaGlyValProArgLeu  
 P81<sub>(120-134)</sub> ArgLeuAlaAlaGlyValProArgLeuPheLeuValSerGluGly  
 P82<sub>(125-139)</sub> GlyValProArgLeuPheLeuValSerGluGlySerValValGln  
 P83<sub>(130-144)</sub> PheLeuValSerGluGlySerValValGlnPheProSerGlyAsn  
 P84<sub>(135-149)</sub> GlySerValValGlnPheProSerGlyAsnPheSerLeuThrAla  
 P85<sub>(140-154)</sub> PheProSerGlyAsnPheSerLeuThrAlaGluThrGluGluArg  
 P86<sub>(145-159)</sub> PheSerLeuThrAlaGluThrGluGluArgAsnPheProGlnGlu  
 P87<sub>(150-164)</sub> GluThrGluGluArgAsnPheProGlnGluAsnGluHisLeuVal  
 P88<sub>(155-169)</sub> AsnPheProGlnGluAsnGluHisLeuValArgTrpAlaGlnLys  
 P89<sub>(160-174)</sub> AsnGluHisLeuValArgTrpAlaGlnLysGluTyrGlyAlaVal  
 P90<sub>(165-179)</sub> ArgTrpAlaGlnLysGluTyrGlyAlaValThrSerPheThrGlu  
 P91<sub>(170-184)</sub> GluTyrGlyAlaValThrSerPheThrGluLeuLysIleAlaArg  
 P92<sub>(175-189)</sub> ThrSerPheThrGluLeuLysIleAlaArgAsnIleTyrIleLys  
 P93<sub>(180-194)</sub> LeuLysIleAlaArgAsnIleTyrIleLysValGlyGluAspGln  
 P94<sub>(185-199)</sub> AsnIleTyrIleLysValGlyGluAspGlnValPheProProThr  
 P95<sub>(190-201)</sub> ValGlyGluAspGlnValPheProProThrCysAsnIleGlyLys  
 P96<sub>(195-209)</sub> ValPheProProThrCysAsnIleGlyLysAsnPheLeuSerLeu  
 P97<sub>(200-214)</sub> CysAsnIleGlyLysAsnPheLeuSerLeuAsnTyrLeuAlaGlu  
 P98<sub>(205-219)</sub> AsnPheLeuSerLeuAsnTyrLeuAlaGluTyrLeuGlnProLys  
 P99<sub>(210-224)</sub> AsnTyrLeuAlaGluTyrLeuGlnProLysAlaAlaGluGlyCys  
 P100<sub>(215-229)</sub> TyrLeuGlnProLysAlaAlaGluGlyCysValLeuProSerGln  
 P101<sub>(220-234)</sub> AlaAlaGluGlyCysValLeuProSerGlnProHisGluLysGlu  
 P102<sub>(225-239)</sub> ValLeuProSerGlnProHisGluLysGluValHisIleIleGlu  
 P103<sub>(230-244)</sub> ProHisGluLysGluValHisIleIleGluLeuIleThrProSer  
 P104<sub>(235-249)</sub> ValHisIleIleGluLeuIleThrProSerSerAsnProTyrSer  
 P105<sub>(240-254)</sub> LeuIleThrProSerSerAsnProTyrSerAlaPheGlnValAsp  
 P110<sub>(265-279)</sub> AspProGluValValLysAsnLeuValLeuIleLeuLysCysLys  
 P111<sub>(270-284)</sub> LysAsnLeuValLeuIleLeuLysCysLysLysSerValAsnTrp  
 P112<sub>(275-289)</sub> IleLeuLysCysLysLysSerValAsnTrpValIleLysSerPhe  
 P113<sub>(280-294)</sub> LysSerValAsnTrpValIleLysSerPheAspValLysGlyAsn  
 P114<sub>(285-299)</sub> ValIleLysSerPheAspValLysGlyAsnLeuLysValIleAla  
 P115<sub>(290-304)</sub> AspValLysGlyAsnLeuLysValIleAlaProAsnSerIleGly

HOJA RECTIFICADA (REGLA 91)

ISA/ES

- 29 -

P106<sub>(245-259)</sub> SerAsnProTyrSerAlaPheGlnValAspIleIleValAspIle  
 P107<sub>(250-264)</sub> AlaPheGlnValAspIleIleValAspIleArgProAlaGlnGlu  
 P108<sub>(255-269)</sub> IleIleValAspIleArgProAlaGlnGluAspProGluValVal  
 P109<sub>(260-274)</sub> ArgProAlaGlnGluAspProGluValValLysAsnLeuValLeu  
 P116<sub>(295-309)</sub> LeuLysValIleAlaProAsnSerIleGlyPheGlyLysGluSer  
 P117<sub>(300-314)</sub> ProAsnSerIleGlyPheGlyLysGluSerGluArgSerMetThr  
 P118<sub>(305-319)</sub> PheGlyLysGluSerGluArgSerMetThrMetThrLysLeuVal  
 P119<sub>(310-324)</sub> GluArgSerMetThrMetThrLysLeuValArgAspAspIlePro  
 P120<sub>(315-329)</sub> MetThrLysLeuValArgAspAspIleProSerThrGlnGluAsn  
 P121<sub>(320-334)</sub> ArgAspAspIleProSerThrGlnGluAsnLeuMetLysTrpAla  
 P122<sub>(325-339)</sub> SerThrGlnGluAsnLeuMetLysTrpAlaLeuAspAsnGlyTyr  
 PP123<sub>(330-344)</sub> LeuMetLysTrpAlaLeuAspAsnGlyTyrArgProValThrSer  
 P124<sub>(335-349)</sub> LeuAspAsnGlyTyrArgProValThrSerTyrThrMetAlaPro  
 P125<sub>(340-354)</sub> ArgProValThrSerTyrThrMetAlaProValAlaAsnArgPhe  
 P126<sub>(345-359)</sub> TyrThrMetAlaProValAlaAsnArgPheHisLeuArgLeuGlu  
 P127<sub>(350-364)</sub> ValAlaAsnArgPheHisLeuArgLeuGluAsnAsnGluGluMet  
 P128<sub>(355-369)</sub> HisLeuArgLeuGluAsnAsnGluGluMetArgAspGluGluVal  
 P129<sub>(360-374)</sub> AsnAsnGluGluMetArgAspGluGluValHisThrIleProPro  
 P130<sub>(365-379)</sub> ArgAspGluGluValHisThrIleProProGluLeuArgIleLeu  
 P131<sub>(370-384)</sub> HisThrIleProProGluLeuArgIleLeuLeuAspProAspHis  
 P132<sub>(375-389)</sub> GluLeuArgIleLeuLeuAspProAspHisProProAlaLeuAsp  
 P133<sub>(380-394)</sub> LeuAspProAspHisProProAlaLeuAspAsnProLeuPhePro  
 P134<sub>(385-399)</sub> ProProAlaLeuAspAsnProLeuPheProGlyGluGlySerPro  
 P135<sub>(390-404)</sub> AsnProLeuPheProGlyGluGlySerProAsnGlyGlyLeuPro  
 P136<sub>(395-409)</sub> GlyGluGlySerProAsnGlyGlyLeuProPheProPheProAsp  
 P137<sub>(400-414)</sub> AsnGlyGlyLeuProPheProPheProAspIleProArgArgGly  
 P138<sub>(405-419)</sub> PheProPheProAspIleProArgArgGlyTrpLysGluGlyGlu

Los péptidos de la Tabla 4 se ensayaron en cuanto a su  
 capacidad de bloquear el TGFβ1 en el modelo de inhibición  
 de la línea celular MV-1-Lu. Puesto que el TGFβ1 es capaz  
 5 de inhibir el crecimiento de esta línea, la inhibición del  
 TGFβ1 por parte de los péptidos sería capaz de restablecer  
 el crecimiento celular. Estos ensayos se muestran en las  
 Figuras 9 a 12.

Como se puede ver en las Figuras 9 a 12 existen varios  
 10 péptidos capaces de inhibir en mayor o menor grado el cre-

- 30 -

cimiento de la línea celular MV-1-Lu, aunque sólo el péptido P54 es capaz de inhibir casi por completo la actividad del TGF $\beta$ 1. Con el fin de realizar un estudio más a fondo de este péptido se realizaron ensayos utilizando diferentes concentraciones de péptido frente a una concentración fija de TGF $\beta$ 1 de 200 pg/ml.

***Ensayo dosis-respuesta de la inhibición del TGF $\beta$ 1 por el péptido P54***

10

Se estudió el efecto de la concentración del péptido P54 sobre la inhibición de la actividad del TGF $\beta$ 1. Debido a la poca solubilidad de este péptido se prepararon soluciones madre de concentración nominal de péptido, tal y como se hizo en el caso del péptido P12, a partir de ellas se tomaron alícuotas que se filtraron o bien se usaron directamente para los ensayos de inhibición.

En la Figura 13 se estudia el efecto inhibidor de concentraciones nominales de péptido, antes y después de filtrar. Se observa que en el filtrado del péptido P54 no hay actividad inhibitoria medible.

Una vez comprobada la capacidad del péptido P54 de inhibir la actividad del TGF $\beta$ 1 de una manera dependiente de la dosis utilizada se procedió a sintetizar nuevos péptidos, tomando como base la secuencia del P54, con el fin de intentar mejorar la solubilidad y con ello su actividad a dosis más bajas. También se sintetizaron dos péptidos procedentes del receptor de tipo III humano. Uno de estos péptidos (P144) es equivalente al péptido P54. El otro péptido (P145) es similar al péptido P106 del receptor de tipo III de rata que también había mostrado actividad. Estos nuevos péptidos se indican en la Tabla 5.



- 31 -

Tabla 5. Péptidos procedentes de la modificación del péptido P54 (péptidos P139 a P143) y del receptor de tipo III humano (péptidos P144 y P145).

5	<u>Péptido</u>	<u>Secuencia</u>	<u>Procedencia</u>
	P54 <sub>(731-742)</sub>	ThrSerLeuAspAlaThrMetIleTrpThrMetMet	Receptor Tipo III Rata
	P139	ThrSerLeuAspAlaThrMetIleTrpAspAspAsp	
	P140	AspAspAspAlaThrMetIleTrpThrMetMet	
10	P141	AspAlaThrMetIleTrpAsp	
	P142	ThrSerLeuMetIleTrpThrMetMet	
	P143	ThrSerLeuAspAlaThrThrMetMet	
	P144 <sub>(729-742)</sub>	ThrSerLeuAspAlaSerIleIleTrpAlaMetMet	Receptor Tipo III Humano
		GlnAsn	
15	P145 <sub>241-254</sub>	SerAsnProTyrSerAlaPheGlnValAspIleThr	Receptor Tipo III Humano
		IleAsp	

El ensayo de actividad de los péptidos de la Tabla 5 se indica en la Figura 14.

#### ***Ensayo dosis-respuesta de la inhibición del TGF $\beta$ 1 por el péptido P144***

Se realizó un ensayo dosis respuesta con el péptido P144 procedente de la secuencia del receptor tipo III humano, con el fin de comprobar si su actividad era dependiente de la concentración (Figura 15). Se puede ver como la actividad del péptido decae conforme se disminuye la concentración de péptido utilizada en los ensayos.

#### **Ensayos de inhibición de la unión del TGF $\beta$ 1 a sus receptores por el péptido P144 (marcaje por afinidad)**

El péptido P144 procedente de la secuencia del receptor de tipo III humano, se utilizó en los ensayos de marca-

- 32 -

je por afinidad para comprobar su capacidad de inhibición de la unión del TGF $\beta$ 1 a sus receptores celulares (Material y Métodos).

Debido a la diferente actividad de los lotes de  $^{125}\text{I}$ -TGF $\beta$ 1 empleados, las concentraciones de péptido utilizadas en los ensayos se ajustaron en función de la concentración del lote  $^{125}\text{I}$ -TGF $\beta$ 1 utilizado en cada caso. Los resultados de estos ensayos se muestran en la Figura 15.

Una vez comprobada la inhibición de la unión del TGF $\beta$ 1 a sus receptores celulares mediante el péptido P144, se realizó un nuevo ensayo con el fin de titular el péptido P144. Se observó que el péptido perdía su actividad a la concentración de  $2 \times 10^5$  veces la concentración molar de  $^{125}\text{I}$ -TGF $\beta$ 1.

***Inhibición del TGF $\beta$ 1 mediante péptidos procedentes de otras proteínas con capacidad de unirse al TGF $\beta$ 1 y predichos como complementarios al TGF $\beta$ 1***

En esta serie se sintetizaron los péptidos de la Tabla 6 procedentes de proteínas capaces de unirse al TGF $\beta$ 1.

Tabla 6. Péptidos procedentes de distintas proteínas capaces de unirse al TGF $\beta$ 1 (receptor tipo II P146, fetuina P147 a P149, endoglina P150 a P154 y  $\alpha$ 2-Macroglobulina P155 a P179). Se indica el número del péptido junto a su posición en la secuencia completa, su secuencia de aminoácidos, así como su procedencia. Por comodidad de síntesis todos los péptidos se sintetizaron con una alanina añadida en el extremo C-terminal que no se indica en la tabla.

- 33 -

	<u>Péptidos</u>	<u>Secuencia</u>	<u>Procedencia</u>
	P146 <sub>(84-101)</sub>	CysValAlaValTrpArgLysAsnAspGluAsnIleThr LeuGluThrValCys	Receptor Tipo II II
5	P147 <sub>(114-132)</sub>	CysAspPheGlnLeuLeuLysLeuAspGlyLysPheSer ValValTyrAlaLysCys	Fetuina
	P148 <sub>(114-132)</sub>	CysAspPheHisIleLeuLysGlnAspGlyGlnPheArg ValCysHisAlaGlnCys	Fetuina
10	P149 <sub>(114-132)</sub>	CysAspIleHisValLeuLysGlnAspGlyPheSerVal LeuPheThrLysCysAsp	Fetuina
	P150 <sub>(247-261)</sub>	GluAlaValLeuIleLeuGlnGlyProProTyrValSer TrpLeu	Endoglina
	P151 <sub>(289-303)</sub>	ValAsnLeuProAspThrArgGlnGlyLeuLeuGluGlu AlaArg	Endoglina
15	P152 <sub>(445-459)</sub>	LeuAspSerLeuSerPheGlnLeuGlyLeuTyrLeuSer ProHis	Endoglina
	P153 <sub>(481-495)</sub>	ProSerIleProGluLeuMetThrGlnLeuAspSerCys GlnLeu	Endoglina
20	P154 <sub>(479-493)</sub>	MetSerProSerIleProGluLeuMetThrGlnLeuAsp SerCys	Endoglina
	P155 <sub>(13-24)</sub>	LeuLeuLeuLeuValLeuLeuProThrAspAlaSer	$\alpha$ 2-Macroglobulina
	P156 <sub>(20-31)</sub>	ProThrAspAlaSerValSerGlyLysProGlnTyr	$\alpha$ 2-Macroglobulina
	P157 <sub>(44-55)</sub>	ThrGluLysGlyCysValLeuLeuSerTyrLeuAsn	$\alpha$ 2-Macroglobulina
	P158 <sub>(166-177)</sub>	TyrIleGlnAspProLysGlyAsnArgIleAlaGln	$\alpha$ 2-Macroglobulina
25	P158 <sub>(166-177)</sub>	TyrIleGlnAspProLysGlyAsnArgIleAlaGln	$\alpha$ 2-Macroglobulina
	P159 <sub>(192-203)</sub>	PheProLeuSerSerGluProPheGlnGlySerTyr	$\alpha$ 2-Macroglobulina
	P160 <sub>(247-258)</sub>	AsnValSerValCysGlyLeuTyrThrTyrGlyLys	$\alpha$ 2-Macroglobulina
	P161 <sub>(248-259)</sub>	ValSerValCysGlyLeuTyrThrTyrGlyLysPro	$\alpha$ 2-Macroglobulina
	P162 <sub>(250-261)</sub>	ValCysGlyLeuTyrThrTyrGlyLysProValPro	$\alpha$ 2-Macroglobulina
30	P163 <sub>(267-278)</sub>	SerIleCysArgLysTyrSerAspAlaSerAspCys	$\alpha$ 2-Macroglobulina
	P164 <sub>(469-480)</sub>	ProCysGlyHisThrGlnThrValGlnAlaHisTyr	$\alpha$ 2-Macroglobulina
	P165 <sub>(554-565)</sub>	AspSerAlaLysTyrAspValGluAsnCysLeuAla	$\alpha$ 2-Macroglobulina
	P167 <sub>(790-801)</sub>	GlnProPhePheValGluLeuThrMetProTyrSer	$\alpha$ 2-Macroglobulina
	P168 <sub>(827-838)</sub>	GlnLeuGluAlaSerProAlaPheLeuAlaValPro	$\alpha$ 2-Macroglobulina
	P169 <sub>(835-836)</sub>	SerValGlnLeuGluAlaSerProAlaPheLeuAla	$\alpha$ 2-Macroglobulina
	P170 <sub>(876-887)</sub>	AlaLeuGluSerGlnGluLeuCysGlyThrGluVal	$\alpha$ 2-Macroglobulina
	P171 <sub>(1001-1012)</sub>	LysSerLysIleGlyTyrLeuAsnThrGlyTyr	$\alpha$ 2-Macroglobulina

- 34 -

P172 <sub>(1005-1016)</sub>	IleGlyTyrLeuAsnThrGlyTyrGlnArgGlnLeu	α2-Macroglobulina
P173 <sub>(1062-1073)</sub>	LysArgLysGluValLeuLysSerLeuAsnGluGlu	α2-Macroglobulina
P174 <sub>(1193-1204)</sub>	ValGlyHisPheTyrGluProGlnAlaProSerAla	α2-Macroglobulina
P175 <sub>(1209-1220)</sub>	ThrSerTyrValLeuLeuAlaTyrLeuThrGlnAla	α2-Macroglobulina
5 P176 <sub>(1211-1222)</sub>	TyrValLeuLeuAlaTyrLeuThrAlaGlnProAla	α2-Macroglobulina
P177 <sub>(1256-1267)</sub>	ValAlaLeuHisAlaLeuSerLysTyrGlyAlaAla	α2-Macroglobulina
P178 <sub>(1232-1243)</sub>	TyrGlyArgAsnGlnGlyAsnThrTrpLeuThrAla	α2-Macroglobulina
P179 <sub>(1234-1245)</sub>	ArgAsnGlnGlyAsnThrTrpLeuThrAlaPheVal	α2-Macroglobulina

10 En las Figuras 17 y 18 se indica la actividad inhibitoria de los péptidos procedentes de la Tabla 10.

Como puede observarse en las Figuras 17 y 18 sólo el péptido P150 mostró actividad superior al 50%. Sin embargo, los péptidos P146 y P149 que habían sido descritos como  
 15 activos por Demetriou M y col (1996) J Biol Chem 271:12755-12761 no resultaron activos en las condiciones utilizadas para este ensayo.

20 ***Medición por citometría de flujo del efecto inhibitorio de péptidos sintéticos sobre la unión del TGFβ1 a sus receptores celulares***

Péptidos procedentes de síntesis anteriores, tanto los que se sintetizaron a partir de la secuencia del TGFβ1 como  
 25 del receptor tipo III, se utilizaron para medir, por citometría de flujo, su capacidad inhibitoria de la unión del TGFβ1 a los receptores celulares. En estos ensayos las células se incuban con el péptido antes de añadir el TGFβ1-biotina que se revelará utilizando avidina-FITC (Material y  
 30 Métodos). Posteriormente se mide la fluorescencia emitida por la avidina-FITC, que será directamente proporcional a la cantidad de TGFβ1 unido a las células e inversamente proporcional a la actividad del péptido. En la Figura 19 y

- 35 -

en la Tabla 7 se indican los resultados obtenidos con los péptidos más relevantes.

Tabla 7. Comparación de la actividad inhibitoria del TGF $\beta$ 1, de algunos péptidos, medida mediante el bioensayo de inhibición del crecimiento de las células MV-1-Lu<sup>1</sup> (concentración de péptido 200  $\mu$ g/ml) con la inhibición de la unión del TGF $\beta$ 1 a sus receptores celulares medida mediante citometría de flujo<sup>2</sup> (concentración de péptido 420  $\mu$ g/ml).

10

Péptidos	bioensayo (%inhibición) <sup>1</sup>	Cysitometría (%inhibición) <sup>2</sup>	Secuencia
P29	77,6	92,34	HisGluProLysGlyTyrHis AlaAsnPheCysLeuGlyPro CysProTyrIleTrpSerLeu AspThr
P11	40	86	HisAlaAsnPheCysLeuGly ProCysProTyrIleTrpSer Leu
P12	96	77	PheCysLeuGlyProCysPro TyrIleTrpSerLeuAspThr
P18	18,2	6,5	LeuTyrAsnGlnHisAsnPro GlyAlaSerAlaAlaProCys Cys
P54	97	82,3	ThrSerLeuAspAlaThrMet IleTrpThrMetMet
P140	-1,7	69,8	AspAspAspAlaThrMetIle TrpThrMetMet
P142	70	72	ThrSerLeuMetIleTrpThr MetMet
P106	40	91	SerAsnProTyrSerAlaPhe GlnValAspIleIleValAsp Ile
P145	21	74,35	SerAsnProTyrSerAlaPhe GlnValAspIleThrIleAsp
P144	88	80	ThrSerLeuAspAlaSerIle IleTrpAlaMetMetGlnAsn

- 36 -

	P150	64	73	GluAlaValLeuIleLeuGln GlyProProTyrValSerTrp Leu
5	P152	45	68,4	LeuAspSerLeuSerPheGln LeuGlyLeuTyrLeuSerPro His

### INHIBICIÓN IN VIVO DE LA ACTIVIDAD DEL TGF $\beta$ 1

10

El péptido P144 procedente de la secuencia del receptor tipo III humano, que había resultado activo en los bioensayos de inhibición del crecimiento de la línea celular MV-1-Lu, se utilizó en los ensayos *in vivo* para estudiar su efecto inhibitorio en la inducción de cirrosis experimental con CCl<sub>4</sub>, en un modelo de ratas.

15

#### ***Modelo de cirrosis experimental en ratas Wistar***

20

En este modelo la cirrosis hepática se induce mediante inhalación de tetracloruro de carbono, durante 11 semanas, dos veces por semana (López Novoa JM y col. (1976) Patología IX:223-240; Camps J. y col. (1987) Gastroenterology 93:498-505) tal y como se indica en Material y Métodos.

25

El péptido P144 se administró de acuerdo a dos protocolos:

30

1. *Protocolo 1*: El péptido se administró en días alternos por vía intraperitoneal durante el proceso de inducción de la cirrosis (11 semanas). Figuras 20 y 21.

2. *Protocolo 2*: El péptido se administró en días alternos por vía intraperitoneal durante 3 semanas, una vez establecida la cirrosis, es decir a las 12 semanas del inicio de la inducción de la cirrosis. Figuras 22 y 23.

35

La producción de colágeno en ambos protocolos se midió mediante dos técnicas:

- 37 -

En la Figuras 36 y 38 se indica la producción de colágeno total medida por tinción de cortes de hígado (dos por animal) teñidos con *Fast Green* y *Direct Red*, elución del color y lectura en espectrofotómetro (Material y Métodos)

5 (López de León A. y Rojkind, (1985) *Histochem. Cytochem.* 33:737-743; Gaudio E. y col. (1993) *Int. J. Exp. Path.* 74:463-469).

En las Figuras 21 y 23 se refleja la producción de colágeno medida por análisis de imagen a partir de cortes

10 de hígado teñidos con rojo sirio, utilizando microscopía de luz (Material y Métodos).

Como se puede ver en la Figura 20 se observan diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre el grupo de ratas tratadas con el péptido P144 ( $Tto_1$ ) y el grupo de ratas cirróticas control ( $Ci_1$ ) al estudiar el cociente colágeno vs proteína total. En la Figura 37 las diferencias entre el grupo de ratas tratadas con el péptido P144 ( $Tto_1$ ) y el grupo de ratas cirróticas control ( $Ci_1$ ) también son significativas ( $P < 0,001$ ) al estudiar el área de fibrosis.

15

Como se puede observar en las figuras 22 y 23, en las que se muestran los resultados de las ratas tratadas una vez establecida la cirrosis, las diferencias entre los grupos de ratas tratadas con el péptido P144 ( $Tto_2$ ) y las cirróticas sin tratar ( $Ci_2$ ) no son significativas cuando se

20

25 utilizan cualquiera de las dos técnicas de medición de fibrosis.

Las dos técnicas utilizadas para la medición de colágeno se compararon entre sí mediante una regresión lineal con el fin de comprobar la aleatoriedad en la elección de

30 los campos a estudio en cada preparación y con ello la validez del análisis de imagen, Figuras 24 y 25.

Como se puede observar en las gráficas 24 y 25 existe una correlación entre ambas técnicas con una  $R > 0,85$  en ambos casos, siendo altamente significativa ( $F \leq 0,001$ ). Esto

35 confirma que la adquisición de las imágenes a estudio se

- 38 -

realizó de forma totalmente aleatoria y con ello la validez de los datos obtenidos mediante el análisis de imagen.

En la figuras 26 y 27 se muestran las imágenes obtenidas por microscopía de luz a partir de preparaciones de hígado teñidas con rojo sirio a un aumento de 10X obtenidas a partir de hígados de las ratas tratadas durante el proceso de inducción de la cirrosis ( $Ci_1$  y  $Tto_1$ ).

Las imágenes de la Figura 26 fueron obtenidas sin aplicar ningún tipo de filtro.

La Figura 27 muestra las imágenes una vez modificadas para su estudio mediante un software específico. Estas modificaciones consisten en la aplicación de dos filtros, uno de luz polarizada y el otro de luz verde, con el fin de aumentar la calidad de las imágenes y facilitar su estudio de forma automatizada.

En las figuras 26 y 27 se observa que existen diferencias entre las imágenes procedentes de las ratas cirróticas ( $Ci_1$ ) y las procedentes de las ratas tratadas con el péptido P144 ( $Tto_1$ ).

Las diferencias de efectividad entre los protocolos 1 y 2 podrían ser debidas a que la producción de  $TGF\beta 1$  podría ser mucho menor una vez inducida la cirrosis (protocolo 2) que durante el proceso de inducción de cirrosis con  $CCl_4$  (protocolo 1), e incluso podría estar en niveles normales, por lo que el efecto del tratamiento con el péptido P144 sería menos notorio en el protocolo 2 que en el protocolo 1.

Cuando se comparan los grupos de ratas cirróticas no tratadas, al final del proceso de inducción de la cirrosis ( $Ci_1$ ) con las cirróticas no tratadas, a las 4 semanas de finalizada la inducción ( $Ci_2$ ) se observa que existen diferencias significativas ( $P=0,016$ ) entre ambos grupos (Figura 28), lo que indicaría que existe una regresión parcial de la cirrosis al eliminar el agente cirrotizante, observación que ha sido publicada por diversos autores (Szende-B y col



- 39 -

(1992) *In Vivo* 6:355-361; Columbano A (1996) *Carcinogenesis* 17:395-400).

Estas diferencias de efectividad entre los dos protocolos también podrían ser debidas al propio protocolo ya que los animales del protocolo 2 se trataron sólo durante 3 semanas en días alternos, mientras que los animales del protocolo 1 se trataron por un periodo más amplio de tiempo (7 semanas, también en días alternos).

Los resultados obtenidos demuestran que es posible inhibir al TGF $\beta$ 1 tanto *in vitro* como *in vivo* mediante péptidos sintéticos procedentes de diferentes proteínas. En un futuro sería de gran interés intentar aumentar la actividad biológica de estos péptidos. Ello podría llevarse a cabo remplazando sistemáticamente cada uno de los aminoácidos de sus secuencias por los 19 restantes. Una vez alcanzado el péptido de mayor actividad convendría preparar mimotopos (McConnell-SJ (1994) *Gene* 151:115-118; Steward-MW (1995) *J. Virol.* 69:7668-7673) del mismo con el fin de aumentar la vida media en el organismo del agente inhibidor.

#### DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1. Inhibición de la unión del TGF $\beta$ 1 a las células MV-1-Lu por el péptido P144, medida por citometría de flujo. A, imagen obtenida al analizar las células incubadas con TGF $\beta$ 1 biotinilado y reveladas con avidina-FITC. B, imagen obtenida al analizar las células incubadas con avidina-FITC sin previa adición de TGF $\beta$ 1. C, imagen obtenida al analizar las células incubadas con TGF $\beta$ 1 previamente incubado con el péptido P144 a una concentración de 0,42  $\mu$ g/ $\mu$ l, el revelado se realizó con avidina-FITC. En abcisas se indica la fluorescencia emitida y en ordenadas el número de células para cada valor de fluorescencia. También se indican los campos correspondientes a las células marcadas con

- 40 -

el TGF $\beta$ 1-biotina y avidina-FITC (M2) y a las células no marcadas (M1).

Figura 2. Esquema representativo del proceso de cirrosis por CCl<sub>4</sub>. Con flechas negras se indica cuando se administró a las ratas dos dosis semanales de CCl<sub>4</sub> y con flechas negras discontinuas cuando fue una dosis semanal. Las flechas grises indican la administración del péptido P144. A: Controles sanos; B: Controles sanos + P144, B<sub>1</sub> : con péptido 70  $\mu$ g/día; C: Cirróticos; C<sub>1</sub> con salino; C<sub>2</sub> con péptido 70  $\mu$ g/día; D: Cirróticos con CCl<sub>4</sub> + Fenobarbital; D<sub>1</sub> y salino; D<sub>2</sub> y péptido 70  $\mu$ g/día.

Figura 3. Efecto del TGF $\beta$ 1 sobre el crecimiento de células MV-1-Lu. Las células se cultivaron a una densidad de 5000 células/pocillo a las concentraciones de TGF $\beta$ 1, en pg/ml indicadas. Abcisas: Concentración TGF $\beta$ 1 (pg/ml); Ordenadas: c.p.m.

Figura 4. Porcentaje de inhibición del TGF $\beta$ 1 (200 pg/ml) por péptidos del TGF $\beta$ 1. Todos los péptidos fueron probados a la concentración de 200  $\mu$ g/ml. Una inhibición del TGF $\beta$ 1 del 100% se corresponde con el crecimiento de las células MV-1-Lu que se obtiene en ausencia de TGF $\beta$ 1.

Figura 5. Porcentaje de inhibición de la actividad del TGF $\beta$ 1 (200 pg/ml) en presencia de distintas concentraciones nominales del péptido P12 filtrado (◆) y sin filtrar (●).

Figura 6. Porcentaje de inhibición del TGF $\beta$ 1 (200 pg/ml) por péptidos del TGF $\beta$ 1. Todos los péptidos fueron probados a la concentración de 200  $\mu$ g/ml. Una inhibición del TGF $\beta$ 1

- 41 -

del 100% se corresponde con el crecimiento de las células MV-1-Lu que se obtiene en ausencia de TGF $\beta$ 1.

Figura 7. Autorradiografía de un ensayo de marcaje por afinidad de los receptores del TGF $\beta$ 1. Calle C1: efecto de la incubación de las células con una concentración 0,16  $\mu$ M de  $^{125}$ I-TGF $\beta$ 1 que se corresponde con una actividad de 0,3  $\mu$ Ci (control positivo). Calle C2: efecto de la preincubación de las células con una concentración de TGF $\beta$ 1 no radioactivo 10 veces superior a la de  $^{125}$ I-TGF $\beta$ 1 (control negativo). Calle C3: la preincubación se realizó con el péptido P29 a una concentración  $10^6$  veces superior a la concentración molar de  $^{125}$ I-TGF $\beta$ 1. Se puede observar la inhibición de la unión del  $^{125}$ I-TGF $\beta$ 1 a los receptores celulares tipo I, II y III tanto por parte del péptido P29 como por el TGF $\beta$ 1 no radioactivo.

Figura 8. Autorradiografía de un ensayo de marcaje por afinidad de los receptores del TGF $\beta$ 1. Calles C1 a C6: efecto de la preincubación de las células MV-1-Lu, con distintas concentraciones del péptido P29 ( $10^6$ ,  $8 \times 10^5$ ,  $6 \times 10^5$ ,  $4 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^5$ ,  $10^5$  veces la concentración molar de  $^{125}$ I-TGF $\beta$ 1 respectivamente), previas a la adición del  $^{125}$ I-TGF $\beta$ 1. Calle C7: efecto de la preincubación de las células MV-1-Lu con TGF $\beta$ 1 no marcado ( $10^2$  veces la concentración molar de  $^{125}$ I-TGF $\beta$ 1) previa a la adición del  $^{125}$ I-TGF $\beta$ 1 (control negativo). Calle C8: efecto de la incubación de las células MV-1-Lu con una concentración 0,42  $\mu$ M de  $^{125}$ I-TGF $\beta$ 1 que se corresponde con una actividad de 0,4  $\mu$ Ci, sin preincubaciones previas (control positivo).

Figura 9. Porcentaje de inhibición del TGF $\beta$ 1 (200 pg/ml) por péptidos del receptor predichos como complementarios a

- 42 -

zonas del TGF $\beta$ 1. Todos los péptidos fueron probados a la concentración de 200  $\mu$ g/ml. Una inhibición del TGF $\beta$ 1 del 100% se corresponde con el crecimiento de las células MV-1-Lu que se obtiene en ausencia de TGF $\beta$ 1.

5

Figura 10. Porcentaje de inhibición del TGF $\beta$ 1 (200 pg/ml) por péptidos solapados procedentes de la región extracelular del receptor tipo III. Todos los péptidos fueron probados a la concentración de 200  $\mu$ g/ml. Una inhibición del TGF $\beta$ 1 del 100% se corresponde con el crecimiento de las células MV-1-Lu que se obtiene en ausencia de TGF $\beta$ 1.

Figura 11. Porcentaje de inhibición del TGF $\beta$ 1 (200 pg/ml) por péptidos solapados procedentes de la región extracelular del receptor tipo III. Todos los péptidos fueron probados a la concentración de 200  $\mu$ g/ml. Una inhibición del TGF $\beta$ 1 del 100% se corresponde con el crecimiento de las células MV-1-Lu que se obtiene en ausencia de TGF $\beta$ 1.

Figura 12. Porcentaje de inhibición del TGF $\beta$ 1 (200 pg/ml) por péptidos solapados procedentes de la región extracelular del receptor tipo III. Todos los péptidos fueron probados a la concentración de 200  $\mu$ g/ml. Una inhibición del TGF $\beta$ 1 del 100% se corresponde con el crecimiento de las células MV-1-Lu que se obtiene en ausencia de TGF $\beta$ 1.

Figura 13. Porcentaje de inhibición de la actividad del TGF $\beta$ 1 (200 pg/ml) en presencia de distintas concentraciones nominales del péptido P54 filtrado (◆) y sin filtrar (●).

30

Figura 14. Porcentaje de inhibición del TGF $\beta$ 1 (200 pg/ml) por péptidos del receptor procedentes de la modificación del péptido P54 (P139 a P143) y de los péptidos procedentes

- 43 -

del receptor de tipo III humano (P144 y P145). Todos los péptidos fueron probados a la concentración de 200  $\mu\text{g/ml}$ . Una inhibición del TGF $\beta$ 1 del 100% se corresponde con el crecimiento de las células MV-1-Lu que se obtiene en  
5 ausencia de TGF $\beta$ 1.

Figura 15. Porcentaje de inhibición de la actividad del TGF $\beta$ 1 (200 pg/ml) en presencia de distintas concentraciones nominales del péptido P144 sin filtrar.

10

Figura 16. Autorradiografía de un ensayo de marcaje por afinidad de los receptores del TGF $\beta$ 1. Calle C1: la preincubación se realizó con el péptido P144 a una concentración  $10^6$  veces superior a la concentración molar de  $^{125}\text{I}$ -TGF $\beta$ 1  
15 Calles C2 y C3: efecto de la preincubación de las células con una concentración de TGF $\beta$ 1 no radioactivo 10 veces superior a la de  $^{125}\text{I}$ -TGF $\beta$ 1 (control negativo). Calle C4 y C5: efecto de la incubación de las células con una concentración 0,1  $\mu\text{M}$  de  $^{125}\text{TGF}\beta$ 1 que se corresponde con una actividad  
20 de 0,2  $\mu\text{Ci}$  (control positivo) Se puede observar la inhibición de la unión del  $^{125}\text{I}$ -TGF $\beta$ 1 a los receptores celulares tanto por parte del péptido P144 como por el TGF $\beta$ 1 no radioactivo.

25 Figura 17. Porcentaje de inhibición del TGF $\beta$ 1 (200 pg/ml) por péptidos procedentes del receptor tipo II humano (P146), de la fetuina (P147 a P149) y de la endoglina (P150 a P154). Todos los péptidos fueron probados a la concentración de 200  $\mu\text{g/ml}$ . Una inhibición del TGF $\beta$ 1 del 100% se  
30 corresponde con el crecimiento de las células MV-1-Lu que se obtiene en ausencia de TGF $\beta$ 1.

- 44 -

Figura 18. Porcentaje de inhibición del TGF $\beta$ 1 (200 pg/ml) por péptidos procedentes de la  $\alpha$ 2-Macroglobulina. Todos los péptidos fueron probados a la concentración de 200  $\mu$ g/ml. Una inhibición del TGF $\beta$ 1 del 100% se corresponde con el crecimiento de las células MV-1-Lu que se obtiene en ausencia de TGF $\beta$ 1.

Figura 19. Porcentaje de inhibición de la unión del TGF $\beta$ 1 a células MV-1-Lu por diferentes péptidos sintéticos. La inhibición se estudió midiendo el porcentaje de células marcadas (emiten fluorescencia) y sin marcar (no emiten fluorescencia) para cada péptido (Material y Métodos).

Figura 20. Efecto de la administración del péptido P144 sobre la síntesis de colágeno durante la inducción de cirrosis experimental con CCl $_4$ . En ordenadas se indica el cociente colágeno vs proteína total. En abcisas se indican los distintos grupos de ratas: Co= ratas sanas; Co+P144= ratas sanas tratadas con el péptido P144; Tto $_1$ = ratas sometidas a inducción de cirrosis con CCl $_4$  y a las que se les suministra el péptido P144 en días alternos durante este periodo y Ci $_1$ = ratas sometidas a inducción de cirrosis con CCl $_4$  durante 11 semanas y que no son tratados con el péptido P144.

Figura 21. Efecto de la administración del péptido P144 sobre la síntesis de colágeno durante la inducción de cirrosis experimental con CCl $_4$ . En ordenadas se indica el cociente entre el área de fibrosis y el área total en preparaciones de tejido teñidas con rojo sirio. En abcisas se indican los distintos grupos de ratas: Co= ratas sanas; Co+P144= ratas sanas tratadas con el péptido; Tto $_1$ = ratas sometidas a inducción de cirrosis con CCl $_4$  y a las que se les suministra el péptido P144 en días alternos durante este periodo y Ci $_1$ = ratas sometidas a inducción de cirrosis con CCl $_4$  durante 11 semanas y que no son tratados con el péptido P144.

Figura 22. Efecto de la administración del péptido P144 sobre la síntesis de colágeno una vez inducida la cirrosis con  $\text{CCl}_4$ . En ordenadas se indica el cociente colágeno vs proteína total. En abcisas se indican los distintos grupos de ratas: Co= ratas sanas; Co+P144= ratas sanas tratadas con el péptido; Tto<sub>2</sub>= ratas sometidas a inducción de cirrosis con  $\text{CCl}_4$  y a las que se les suministra el péptido P144 en días alternos al final de este periodo y Ci<sub>2</sub>= ratas sometidas a inducción de cirrosis con  $\text{CCl}_4$  durante 11 semanas y que no son tratados con el péptido P144.

Figura 23. Efecto de la administración del péptido P144 sobre la síntesis de colágeno una vez inducida la cirrosis con  $\text{CCl}_4$ . En ordenadas se indica el cociente entre el área de fibrosis y el área total en preparaciones de tejido. En abcisas se indican los distintos grupos de ratas: Co= ratas sanas; Co+P144= ratas sanas tratadas con el péptido; Tto<sub>2</sub>= ratas sometidas a inducción de cirrosis con  $\text{CCl}_4$  y a las que se les suministra el péptido P144 en días alternos al final de este periodo y Ci<sub>2</sub>= ratas sometidas a inducción de cirrosis con  $\text{CCl}_4$  durante 11 semanas y que no son tratados con el péptido P144.

Figura 24. Comparación entre los datos sobre cantidad de colágeno y área de fibrosis, obtenidos mediante las dos técnicas utilizadas. En el eje de abcisas se indican los valores del cociente entre el área de fibrosis y el área total, obtenidos mediante el análisis de imagen. En ordenadas se indican los valores del cociente entre los  $\mu\text{g}$  de colágeno y los  $\text{mg}$  de proteína total, obtenidos mediante el análisis por espectrofotometría de cortes de hígado teñidos con "Direct Red y Fast Green". Se indica la  $R^2$ . ( $F \leq 0,001$ ).

- 46 -

Figura 25. Comparación entre los datos sobre cantidad de colágeno y área de fibrosis, obtenidos mediante las dos técnicas utilizadas para el estudio de las muestras al final del protocolo 2. En el eje de abscisas se indican los valores del cociente entre el área de fibrosis y el área total, obtenidos mediante el análisis de imagen. En ordenadas se indican los valores del cociente entre los  $\mu\text{g}$  de colágeno y los  $\text{mg}$  de proteína total, obtenidos mediante el análisis por espectrofotometría de cortes de hígado teñidos con "Direct Red y Fast Green". Se indica la  $R^2$ . ( $F \leq 0,001$ ).

Figura 26. Imágenes representativas de los 24 campos obtenidos por microscopía de luz (10X) a partir de preparaciones de hígados de ratas teñidas con rojo sirio. Ratas cirróticas ( $\text{Ci}_1$ ) al final de la inducción de cirrosis con  $\text{CCl}_4$  y cirróticas tratadas ( $\text{Tto}_1$ ) con el péptido P144 durante el proceso de inducción de la cirrosis con  $\text{CCl}_4$ . Se tomaron diferentes campos a partir de las preparaciones procedentes de cada animal (R= rata y C= campo).

Figura 27. Imágenes representativas de los 24 campos obtenidos por microscopía de luz (10X) a partir de preparaciones de hígados de ratas teñidas con rojo sirio. Ratas cirróticas ( $\text{Ci}_1$ ) al final de la inducción de cirrosis con  $\text{CCl}_4$  y cirróticas tratadas ( $\text{Tto}_1$ ) con el péptido P144 durante el proceso de inducción de la cirrosis con  $\text{CCl}_4$ . Se tomaron diferentes campos a partir de las preparaciones procedentes de cada animal (R= rata y C= campo). Se ha utilizado luz polarizada y filtro verde con el fin de resaltar las fibras de colágeno.

Figura 28. Comparación entre los dos grupos de ratas cirróticas no tratadas.  $\text{Ci}_1$  son ratas cirróticas al final de las 12 semanas de inducción de la cirrosis con  $\text{CCl}_4$ ,  $\text{Ci}_2$  son ratas cirróticas a las 4 semanas del final del proceso de



- 47 -

inducción de la cirrosis.  $P=0,016$ . Ordenadas: Area  
fibrosis/Area total.

REIVINDICACIONES

1.- Péptidos antagonistas de la unión de TGF $\beta$ 1 a sus receptores en el organismo, caracterizados por presentar secuencias de aminoácidos parciales idénticas o similares a las del propio TGF $\beta$ 1 y/o sus receptores.

2.- Péptido activo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por poseer la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1.

10 3.- Péptido activo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por poseer la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2.

15 4.- Péptido activo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por poseer la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3.

5.- Péptido activo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por poseer la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:4.

20 6.- Péptido activo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por poseer la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:5.

7.- Péptido activo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por poseer la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:6.

25 8.- Péptido activo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por poseer la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:7.

30 9.- Péptido activo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por poseer la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:8.

10.- Péptido activo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por poseer la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9.

- 49 -

11.- Péptido activo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por poseer la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:10.

5 12.- Mimotopos de cualquiera de los péptidos activos de las reivindicaciones 1 a 11 caracterizados por presentar un efecto antagonista similar a los mismos y una mayor vida media en el organismo que éstos.

10 13.- Procedimiento de utilización de al menos uno de los péptidos activos de las reivindicaciones 1 a 11 y/o al menos uno de sus mimotopos para fabricar una composición de aplicación en enfermedades hepáticas.

15 14.- Procedimiento de utilización de al menos un ADN que codifique para al menos uno de los péptidos activos de las reivindicaciones 1 a 11 para fabricar una composición de aplicación en enfermedades hepáticas que incluya opcionalmente al menos uno de los mimotopos de dichos péptidos activos.

20 15.- Procedimiento de utilización de al menos un sistema de expresión recombinante que codifique para al menos uno de los péptidos activos de las reivindicaciones 1 a 11 para fabricar una composición de aplicación en enfermedades hepáticas que incluya opcionalmente al menos uno de los mimotopos de dichos péptidos activos.

25 16.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15, caracterizado porque el sistema recombinante es un adenovirus defectivo.

17.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15, caracterizado porque el sistema recombinante es un plásmido.

30 18.- Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 13 a 17 de aplicación a la fibrosis hepática.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

1/28

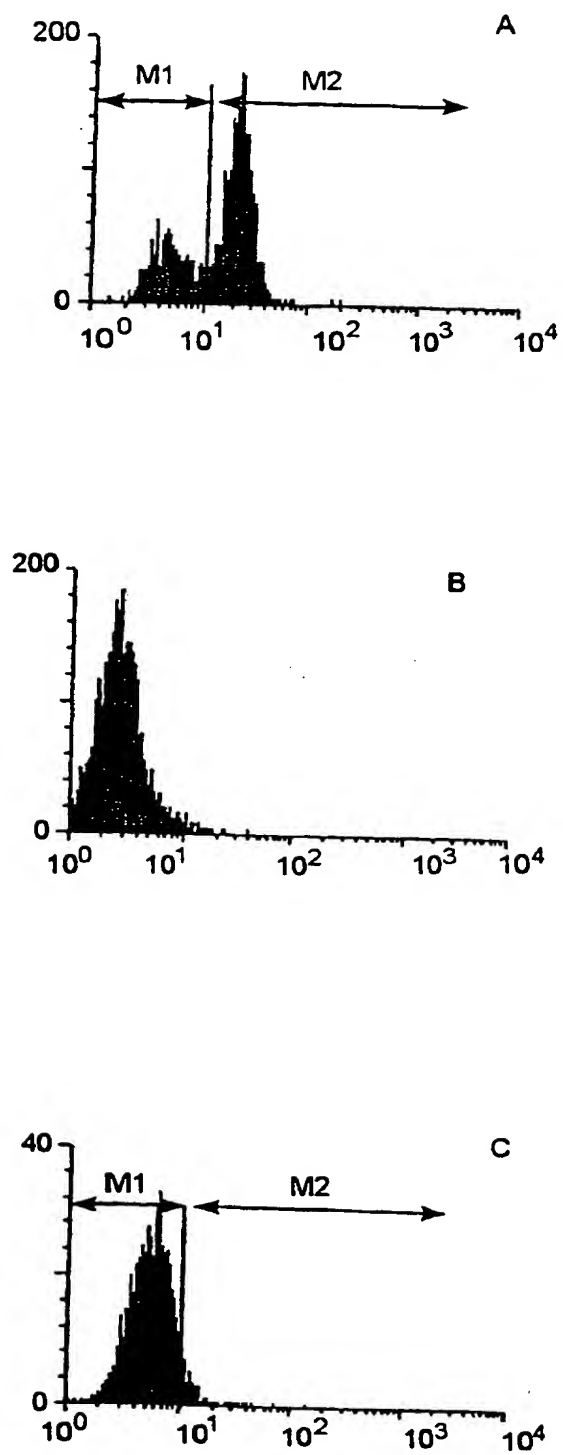


FIGURA 1

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

2/28

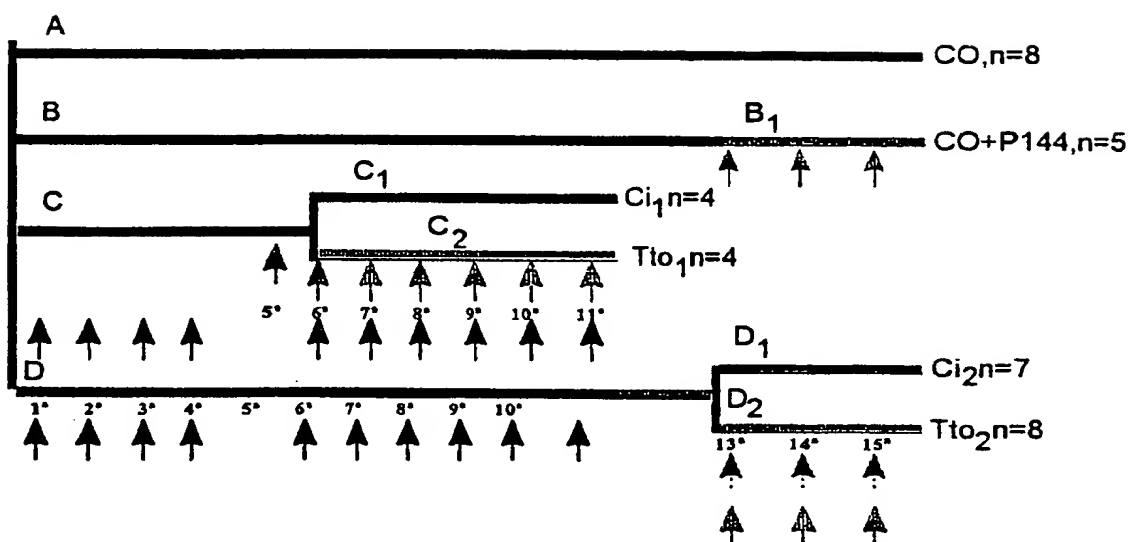
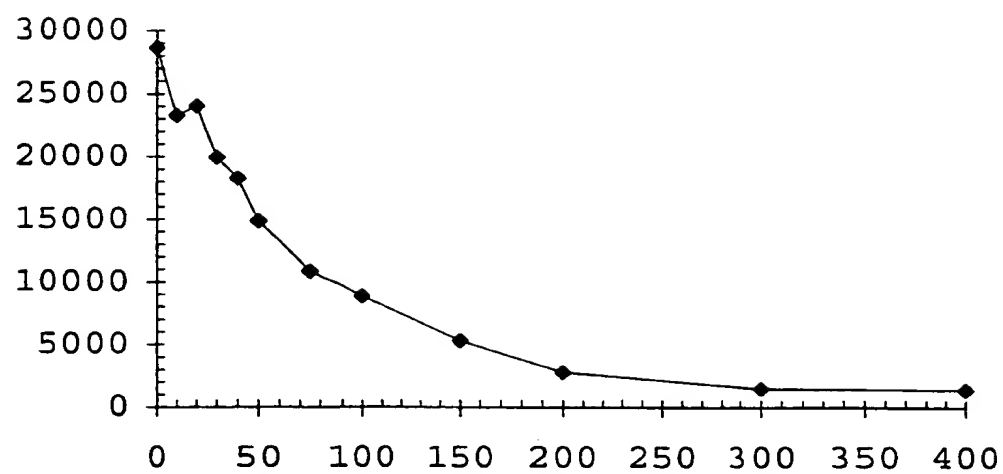


FIGURA 2

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



3/28

**FIGURA 3**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

4/28

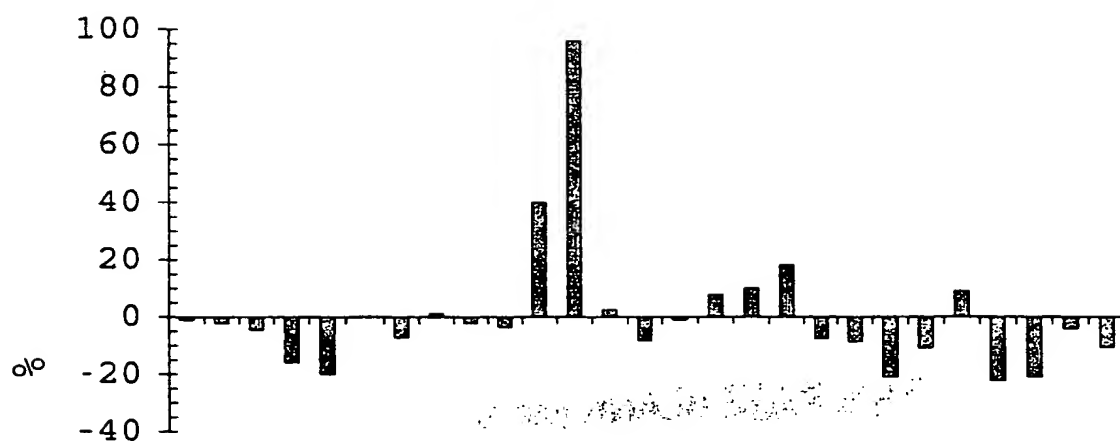


FIGURA 4

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

5/28

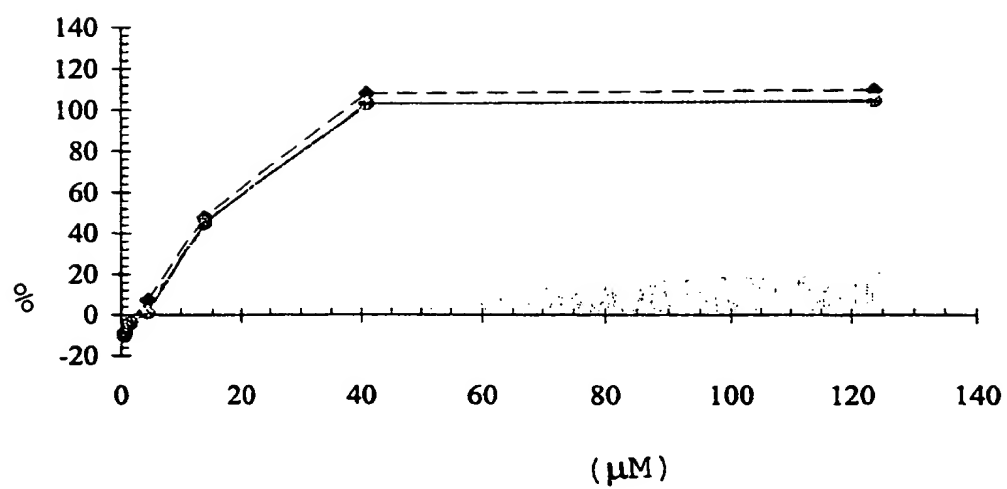


FIGURA 5

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

6/28

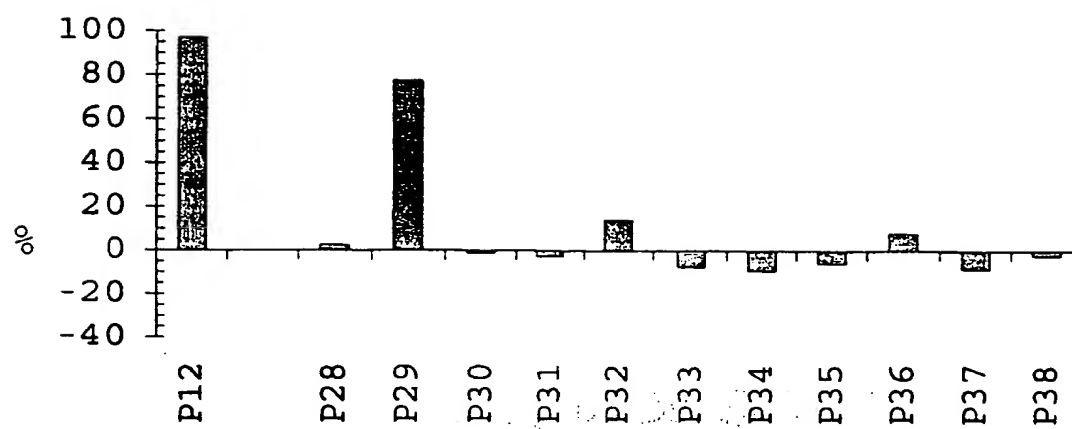


FIGURA 6

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



7/28

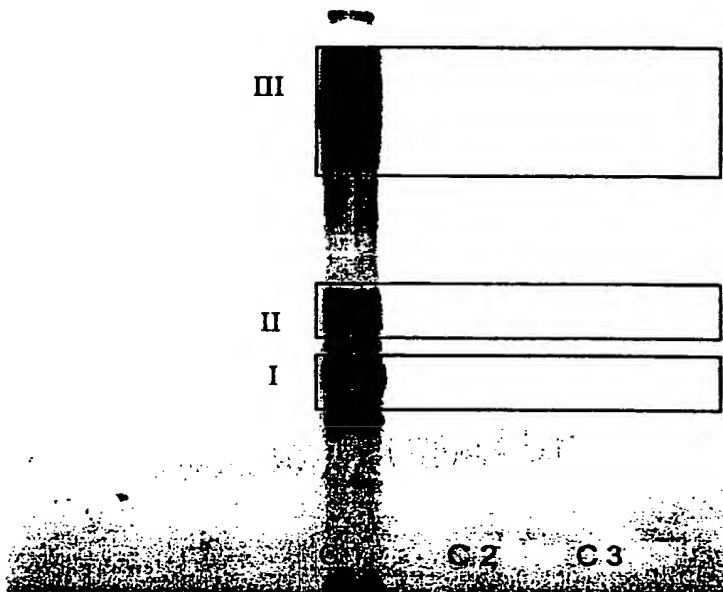


FIGURA 7

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

8/28

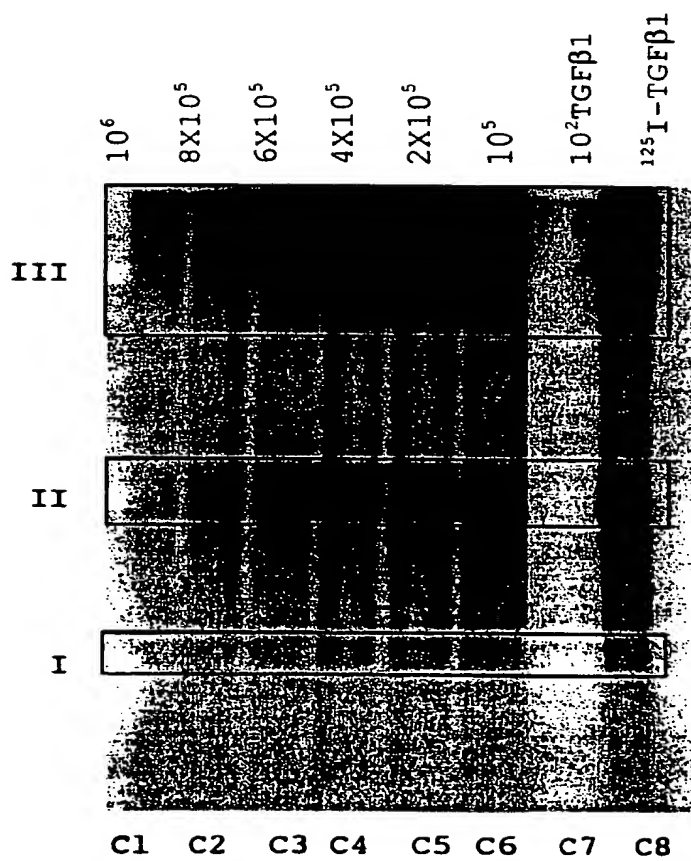


FIGURA 8

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

9/28

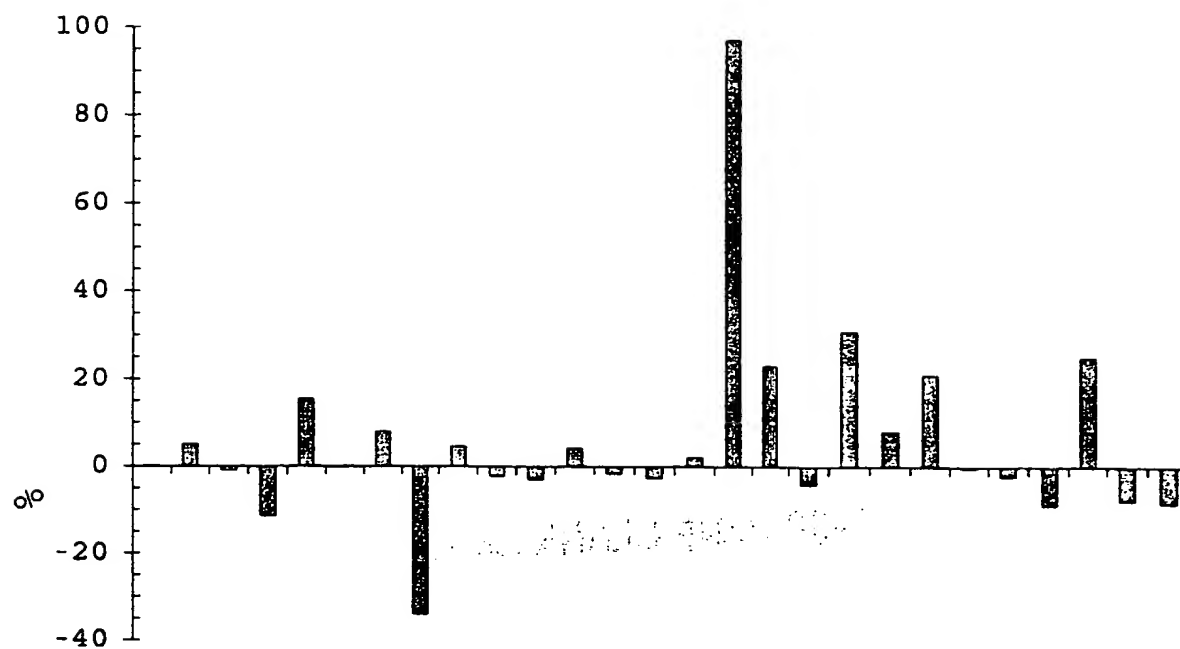


FIGURA 9

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

10/28

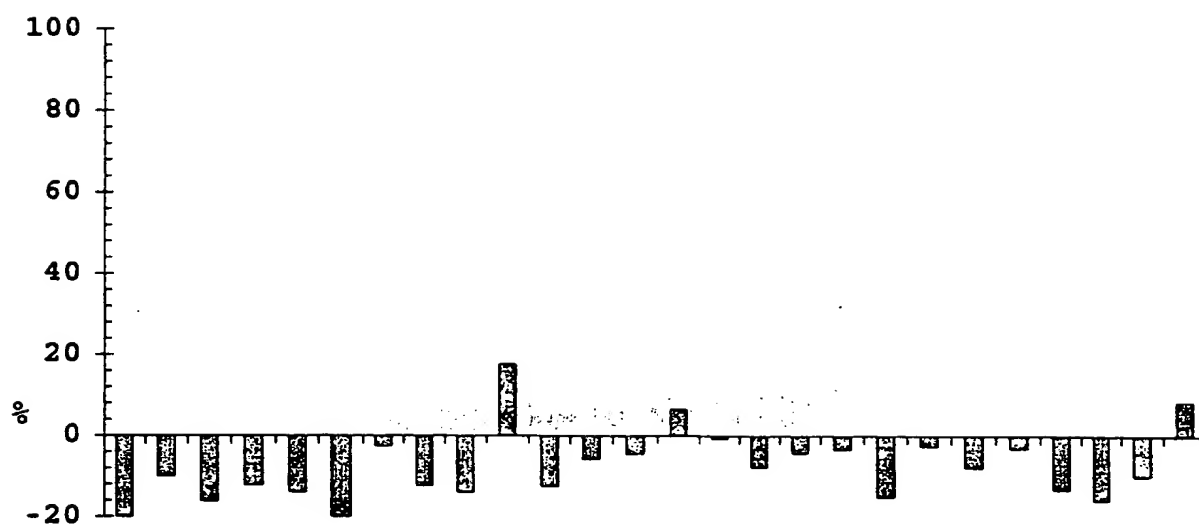


FIGURA 10

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



11/28

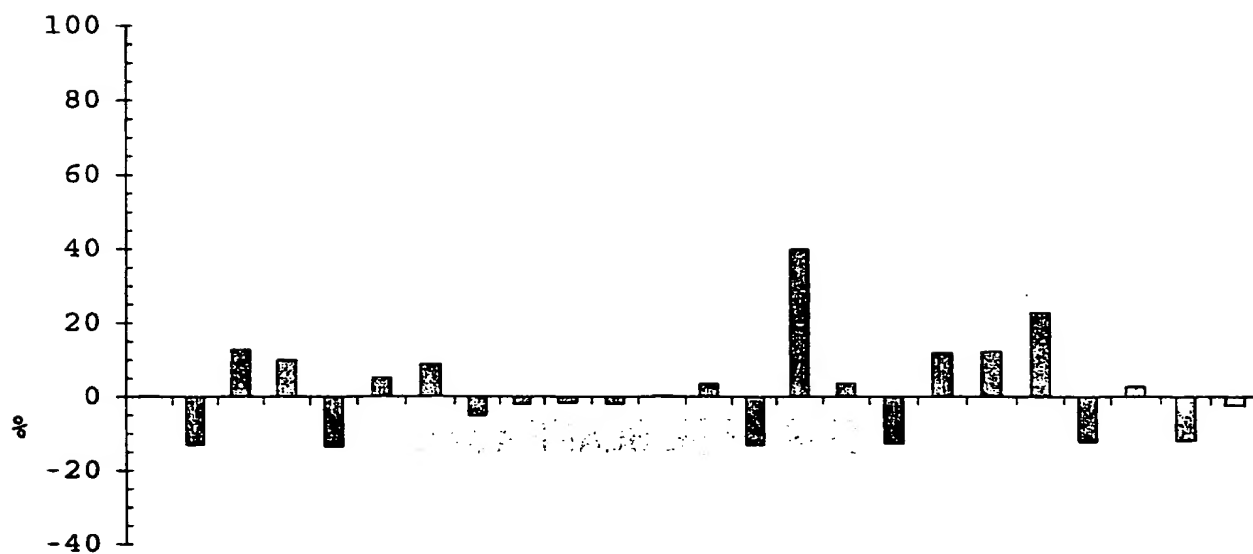


FIGURA 11

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

12/28

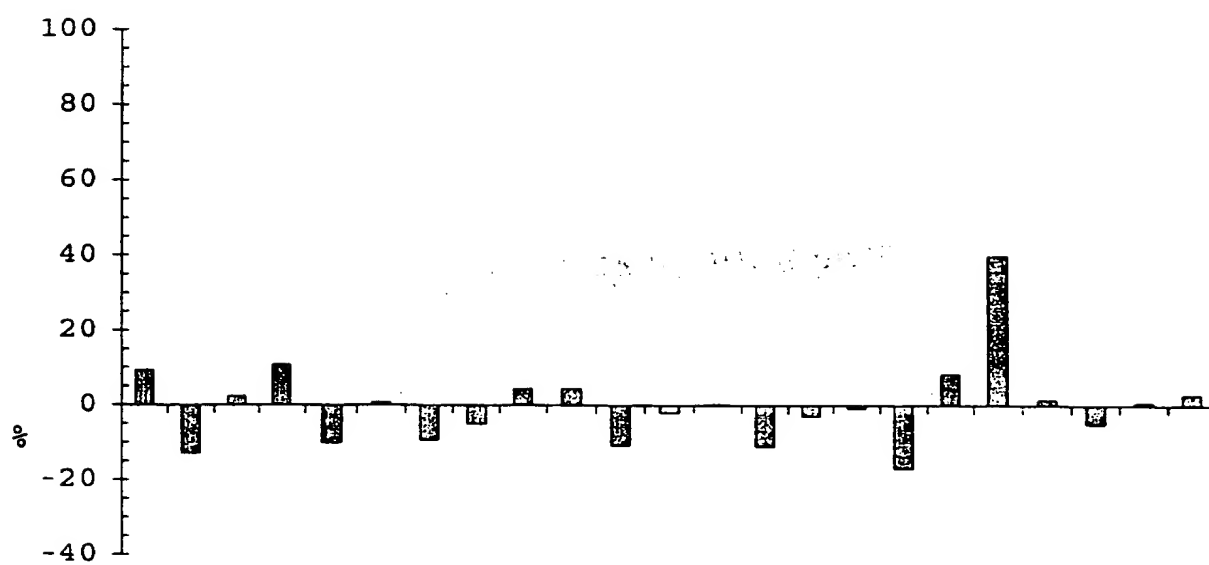


FIGURA 12

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

13/28

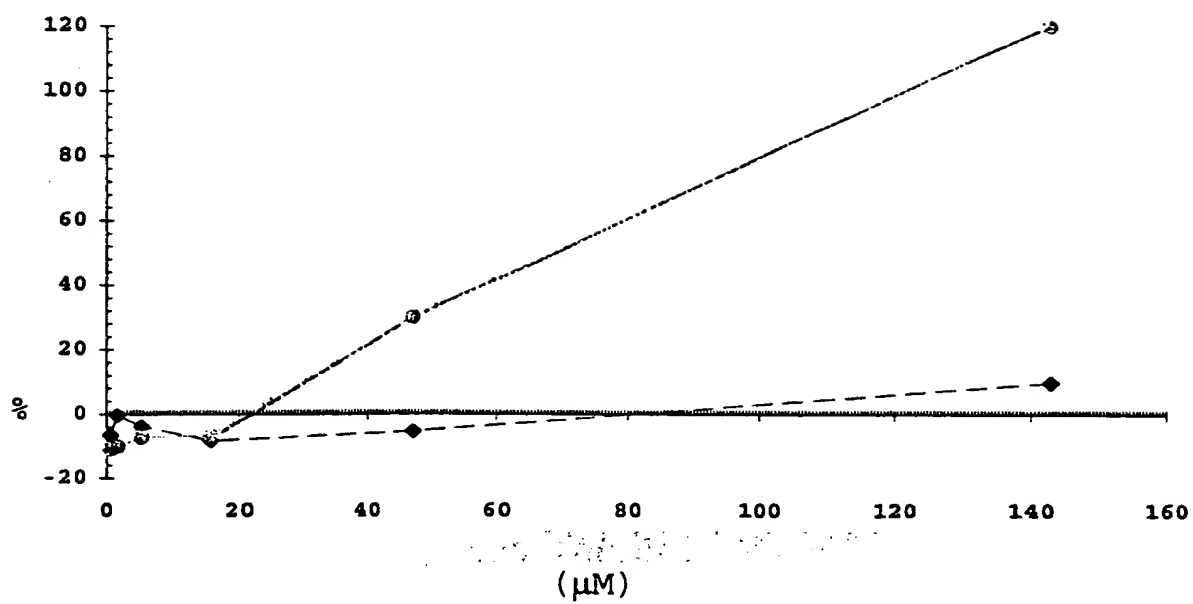


FIGURA 13

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

14/28

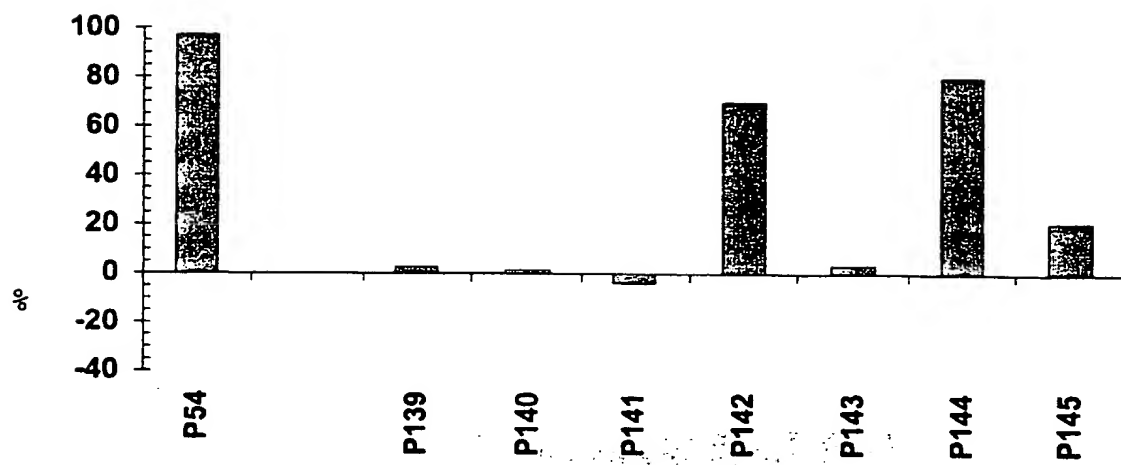


FIGURA 14

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



15/28

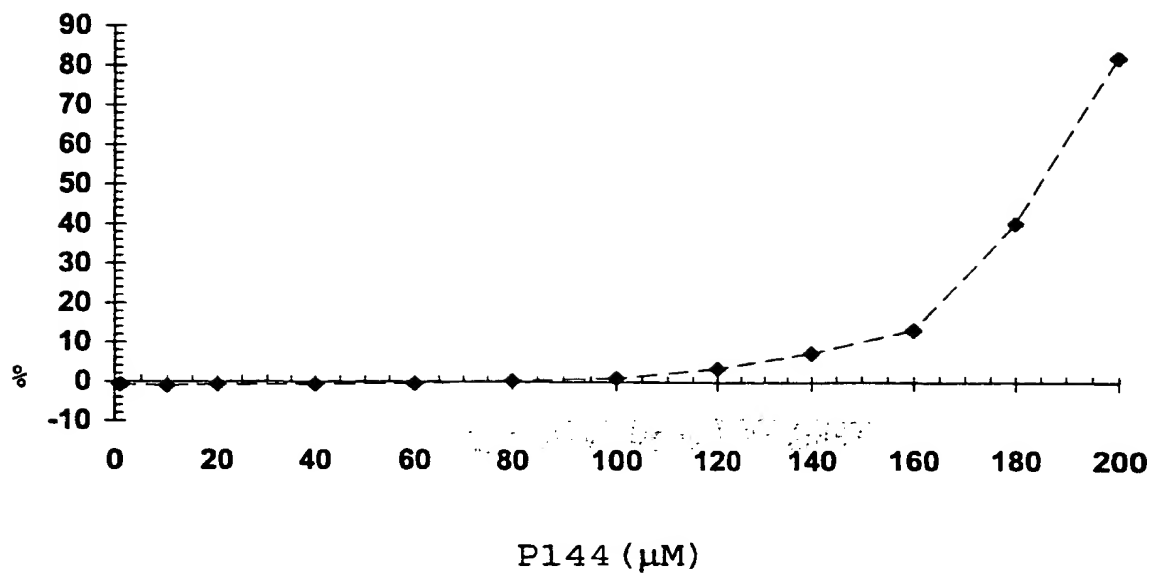


FIGURA 15

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

16/28

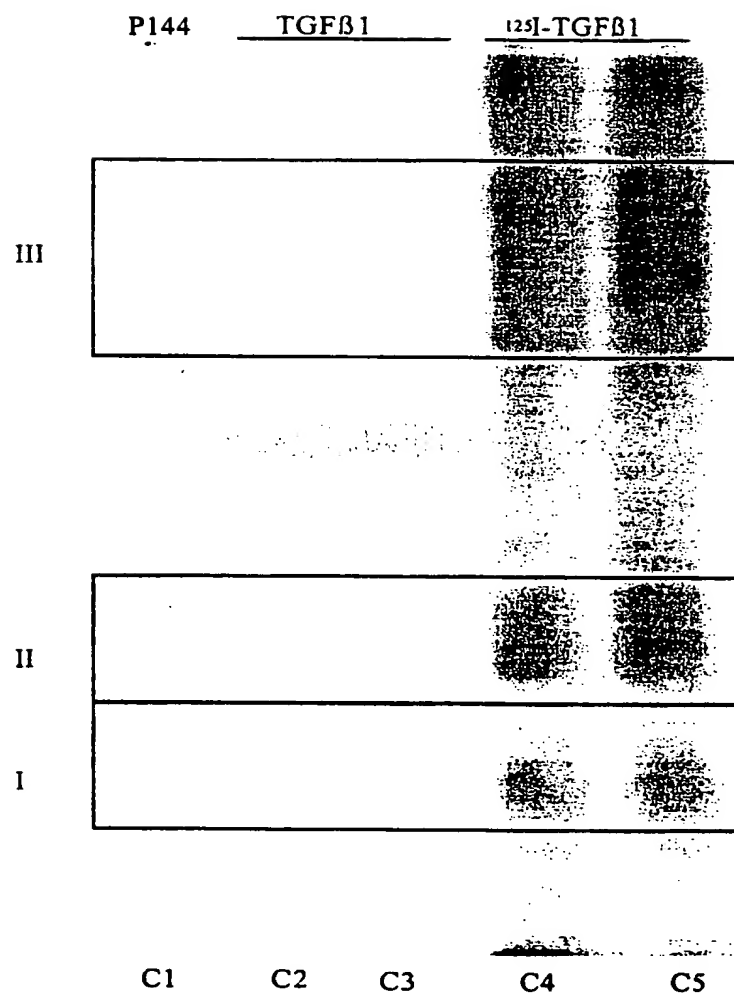


FIGURA 16

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

17/28

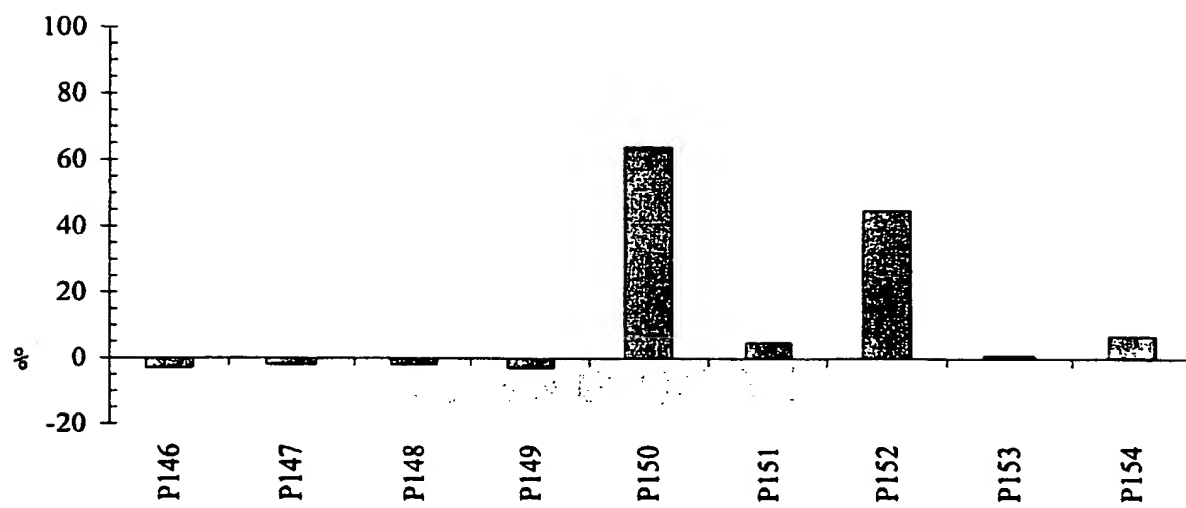


FIGURA 17

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

18/28

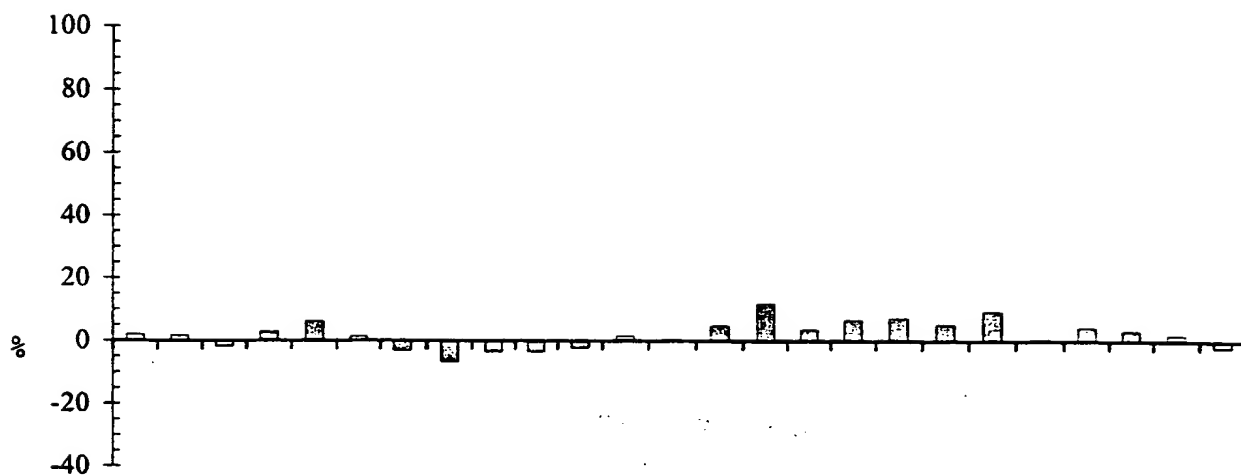


FIGURA 18

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



19/28

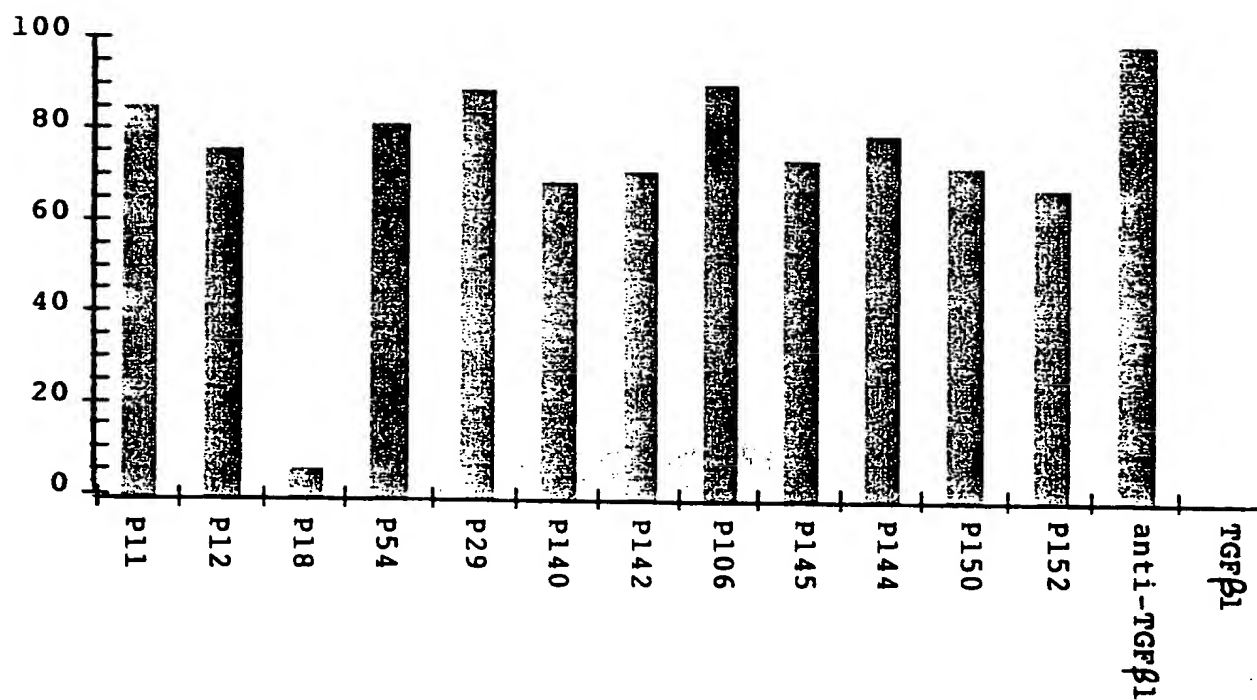


FIGURA 19

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

20/28

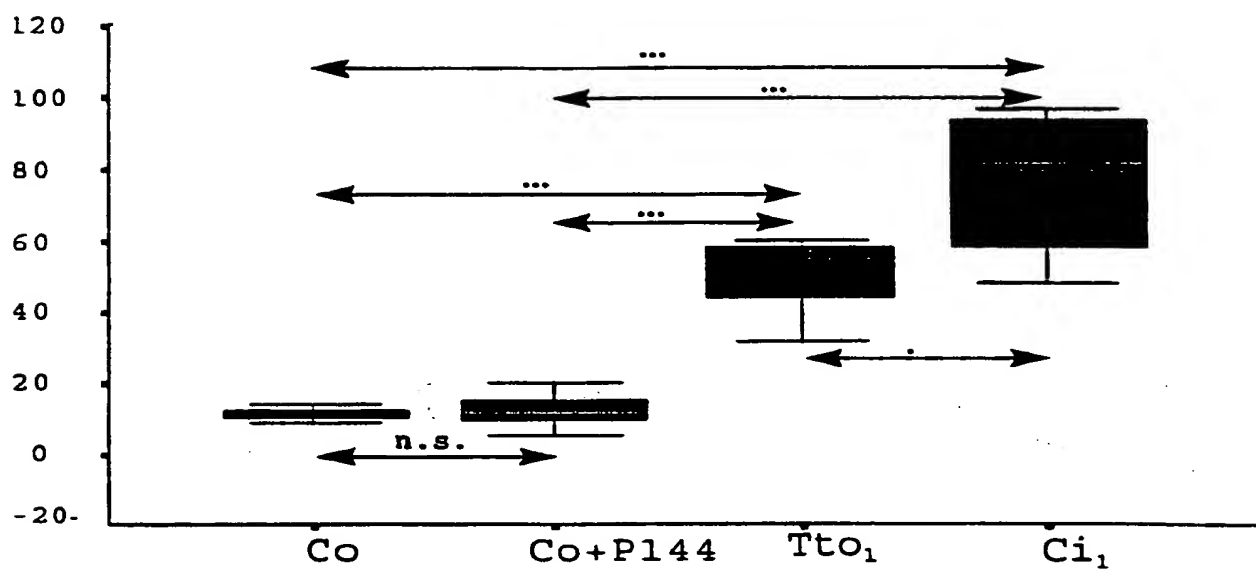


FIGURA 20

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

21/28

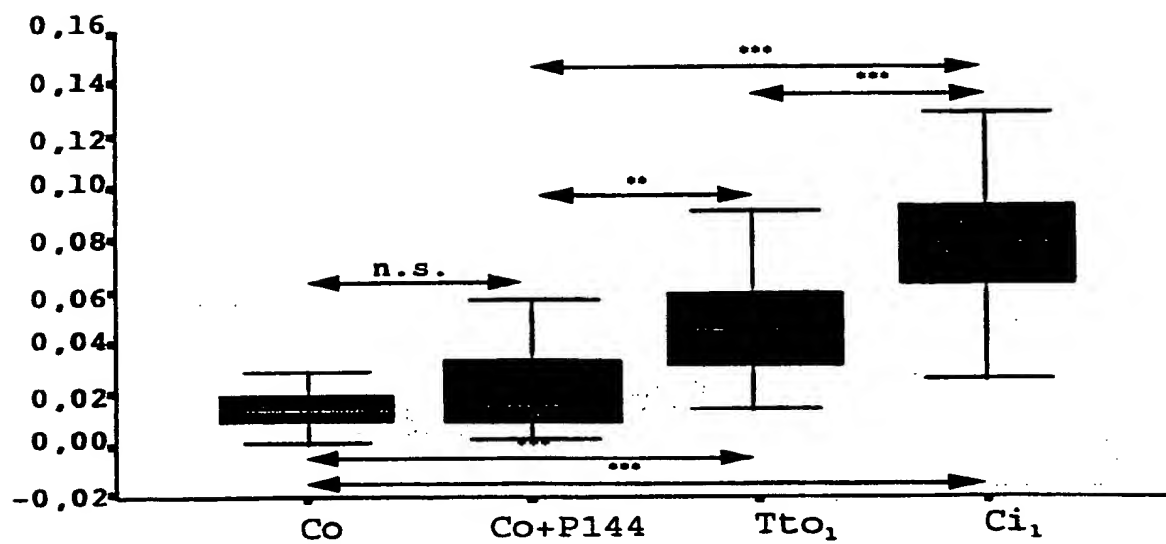


FIGURA 21

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

22/28

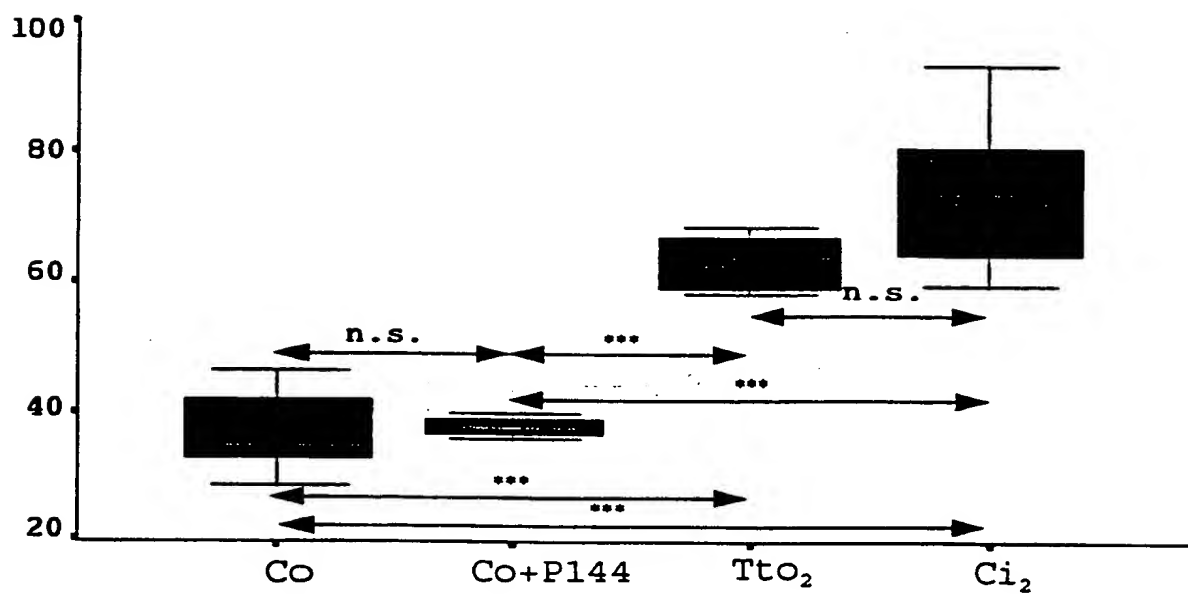


FIGURA 22

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



23/28

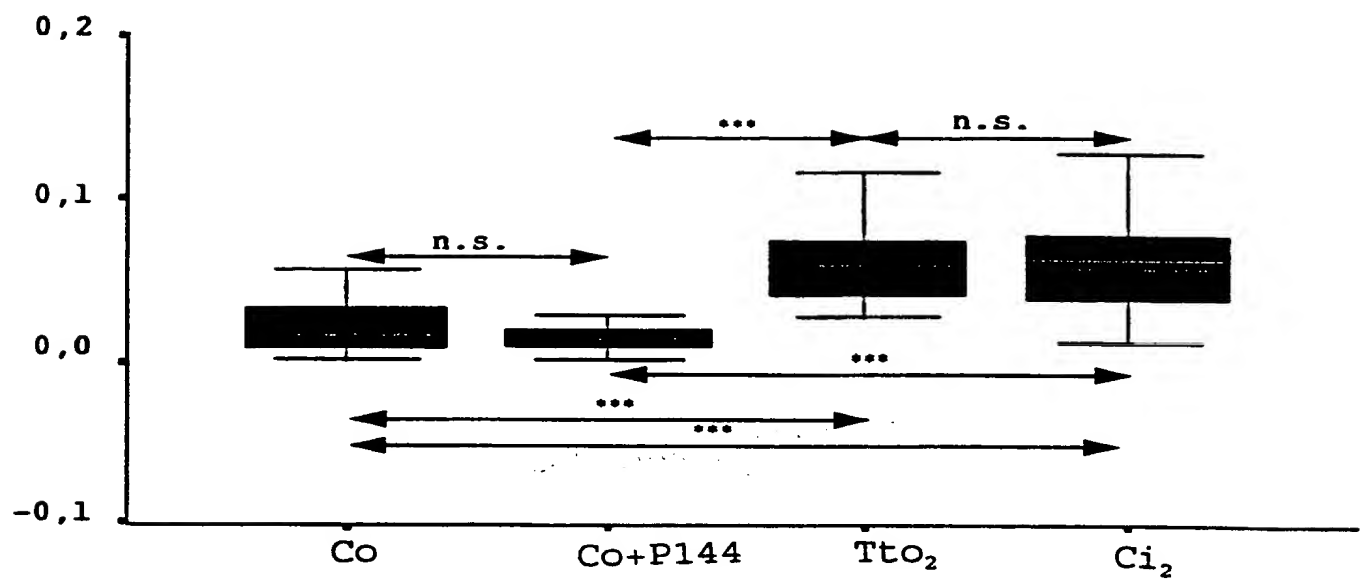


FIGURA 23

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

24/28

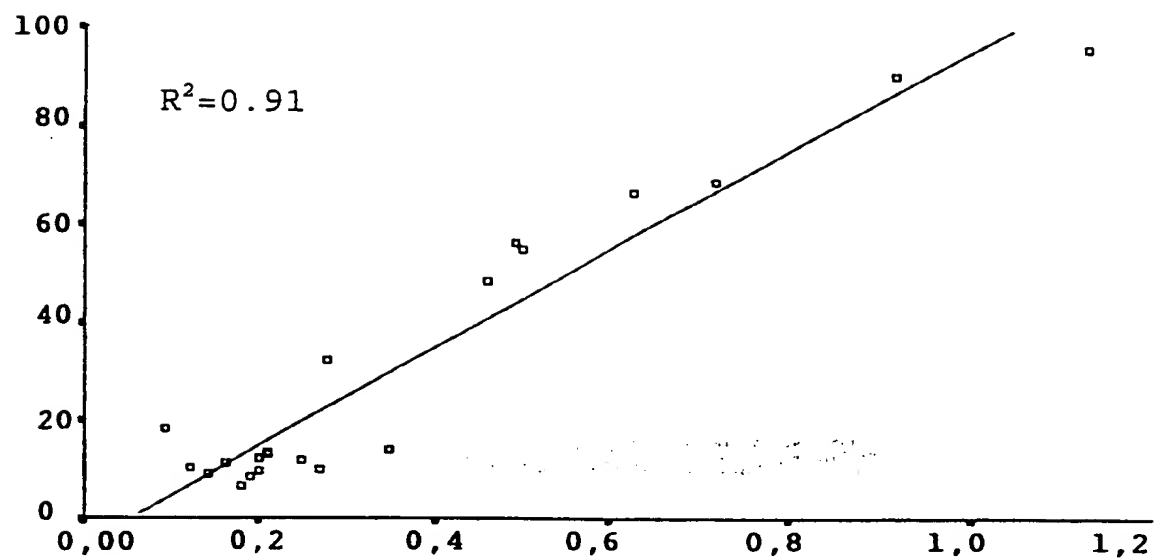


FIGURA 24

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

25/28

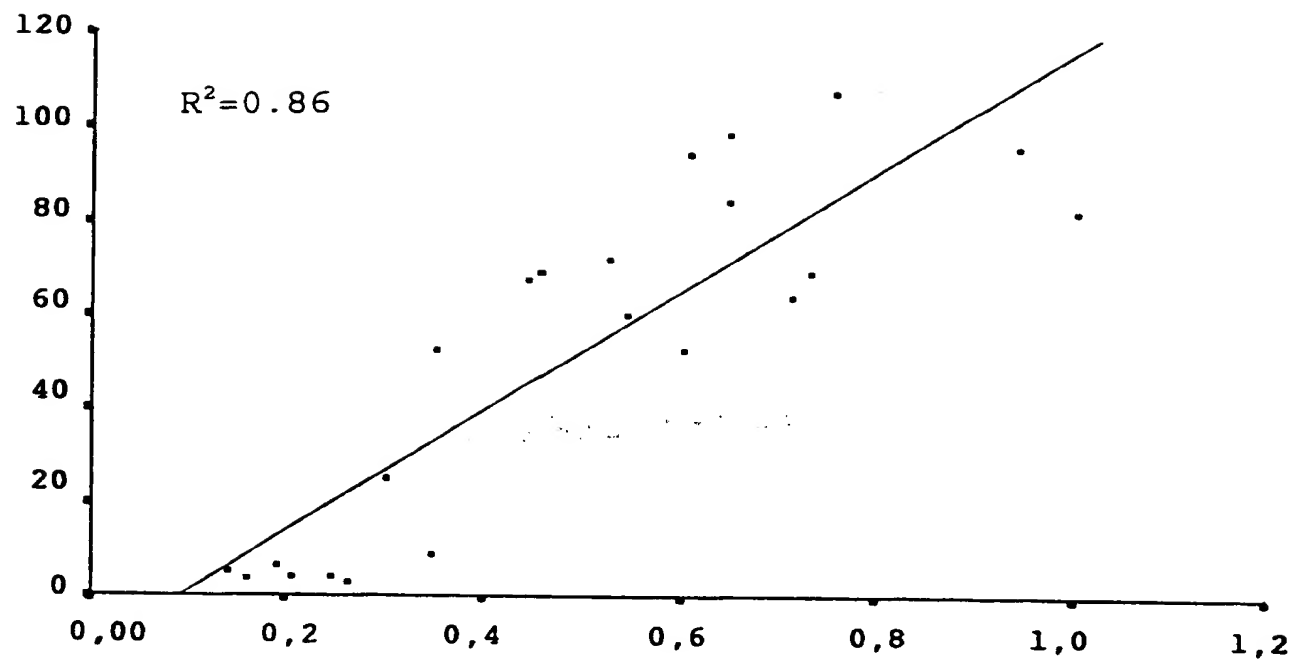


FIGURA 25

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

26/28

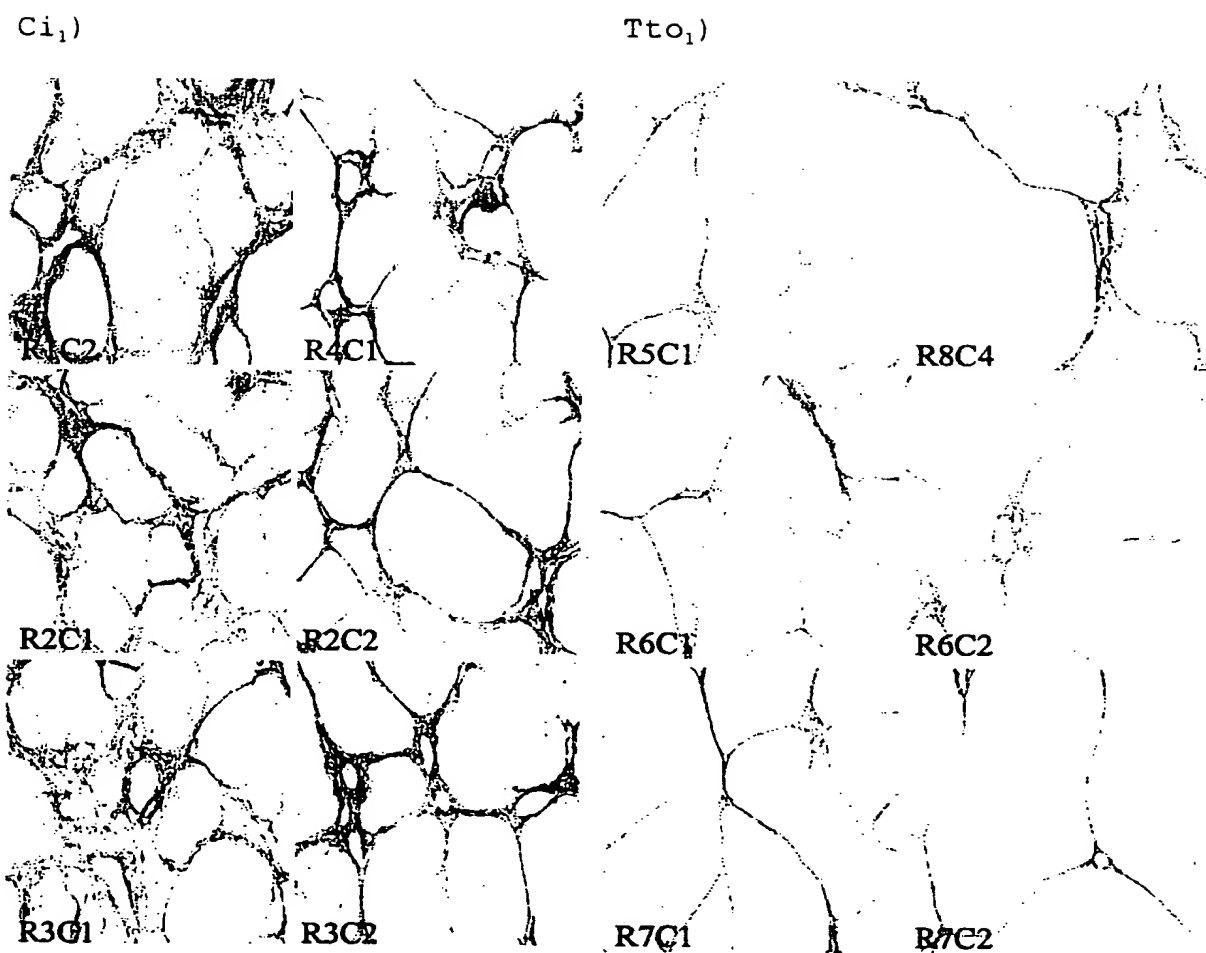


FIGURA 26

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



27/28

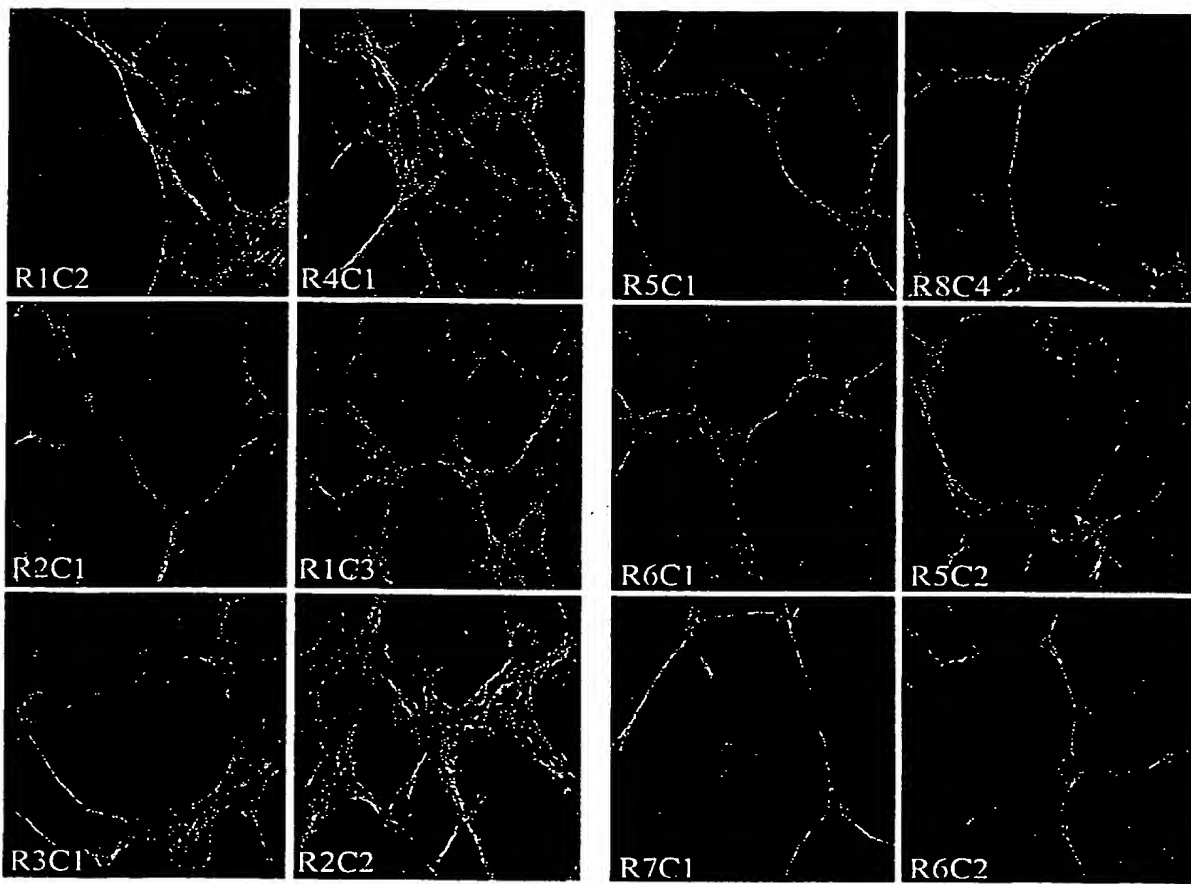
 $Ci_1)$  $Tto_1)$ 

FIGURA 27

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

28/28

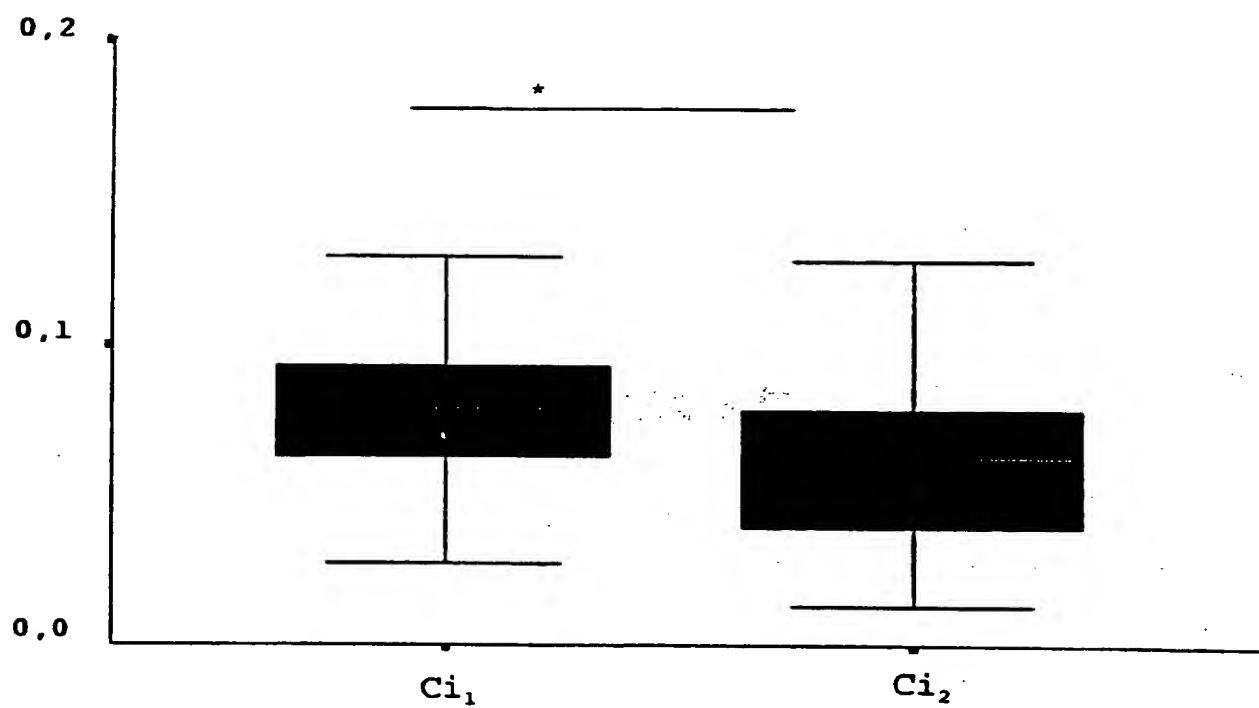


FIGURA 28

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

- 1 -

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Instituto Científico y Tecnológico de Navarra (ICTN)

<120> Péptidos inibidores de TGFβ1

<160> 10

<210> SEQ ID NO: 1

<211> 15

<212> Péptido

<213> Secuencia artificial

<220> Dominio

<223> Procedente de TGFβ1, posición 319-333

```
<400> His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp
              5              10
```

Ser Leu  
15

<210> SEO ID NO: 2

<211> 14

<212> Péptido

<213> Secuencia artificial

<220> Dominio

<223> Procedente de TGFβ1, posición 322-335

<400> Phe Cys Leu Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp  
                    5                    10

Thr

<210> SEQ ID NO: 3

<211> 12

<212> Péptido

<213> Secuencia artificial

<220> Dominio

<223> Deducido como complementario a TGFβ1, posición 731-742

<400> Thr Ser Leu Asp Ala Thr Met Ile Trp Thr Met Met  
5 10

<210> SEQ ID NO: 4

<211> 15

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

- 2 -

<212> Péptido  
<213> Secuencia artificial  
<220> Dominio  
<223> Solapado con la región extracelular del receptor tipo III  
de rata posición 245-259  
<400> Ser Asn Pro Tyr Ser Ala Phe Gln Val Asp Ile Ile Val  
                                  5                                  10  
      Asp Ile  
          15

<210> SEQ ID NO: 5  
<211> 9  
<212> Péptido  
<213> Secuencia artificial  
<220> Dominio  
<223> Modificación P54 deducido como complementario a  
TGFB1, posición 731-742  
<400> Thr Ser Leu Met Ile Trp Thr Met Met  
                                  5

<210> SEQ ID NO: 6  
<211> 14  
<212> Péptido  
<213> Secuencia artificial  
<220> Dominio  
<223> Procedente del receptor tipo III humano modificado,  
posición 729-742  
<400> Thr Ser Leu Asp Ala Ser Ile Ile Trp Ala Met Met Gln  
                                  5                                  10  
      Asn

<210> SEQ ID NO: 7  
<211> 14  
<212> Péptido  
<213> Secuencia artificial  
<220> Dominio  
<223> Procedente del receptor tipo III humano modificado posición  
241-254

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



- 3 -

<400> Ser Asn Pro Tyr Ser Ala Phe Gln Val Asp Ile Thr Ile  
                                  5                                  10  
          Asp

<210> SEQ ID NO: 8

<211> 15

<212> Péptido

<213> Secuencia artificial

<220> Dominio

<223> Posición 247-261 de la Endoglina

<400> Glu Ala Val Leu Ile Leu Gln Gly Pro Pro Tyr Val Ser  
                                  5                                  10  
          Trp Leu  
                  15

<210> SEQ ID NO: 9

<211> 15

<212> Péptido

<213> Secuencia artificial

<220> Dominio

<223> Posición 445-459 de la Endoglina

<400> Leu Asp Ser Leu Ser Phe Gln Leu Gly Leu Tyr Leu Ser  
                                  5                                  10  
          Pro His  
                  15

<210> SEQ ID NO: 10

<211> 23

<212> Péptido

<213> Secuencia artificial

<220> Dominio

<223> Modificación P12, situación 322-335 de TGFβ1

<400> His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn Phe Cys Leu Gly  
                                  5                                  10  
          Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr  
                  15                                  20

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/ ES 99/00375

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC7 : C07K 14/495, C07K 14/71, A61K 38/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC7 : C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

CIBEPAT, EPODOC, PAJ, MEDLINE, EMBASE, REGISTRY, CAS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2720069 A1 (I.N.S.E.R.M.), 24 November 1995 (24.11.95), the whole Document	1, 12-18
X	WO 9625178 A1 (The University of Utah) 22 August 1996 (22.08.96), the whole document	1, 12-18
X	WO 9220793 A1 (The Salk Institute for Biological Studies) 26 November 1992 (26.11.92), the whole document	1, 12-18

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
08 March 2000 (08.03.00)

Date of mailing of the international search report  
14 March 2000 (14.03.00)

Name and mailing address of the ISA/S.P.T.O.

Authorized officer

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No

PCT/ ES 99/00375

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2720069 A1	24.11.1995	NONE	
WO 9625178 A1	28.08.1996	AU 4922096 A AU 694621 B CA 2213198 A EP 0809517 A JP 11500128 T T US 5824655 A	04.09.1996 23.07.1998 22.08.1996 03.12.1997 06.01.1999 20.10.1998
WO 9220793 A1	26.11.1992	AU 1994592 A AU 654724 B CA 2086327 A EP 0542971 A JP 6500574T T US 5885794 A	30.12.1992 17.11.1994 11.11.1992 26.05.1993 20.01.1994 23.03.1999

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°  
PCT/ ES 99/00375

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP<sup>7</sup> C07K 14/495, C07K 14/71, A61K 38/18

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)

CIP<sup>7</sup> C07K A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, PAJ, MEDLINE, EMBASE, REGISTRY, CAS

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
X	FR 2720069 A1 (I.N.S.E.R.M.), 24.11.1995, todo el documento	1, 12-18
X	WO 9625178 A1 (The University of Utah) 22.08.1996, todo el documento	1, 12-18
X	WO 9220793 A1 (The Salk Institute for Biological Studies) 26.11.1992, todo el documento	1, 12-18

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familia de patentes se indican en el anexo

\* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 08 Marzo 2000 (08.03.2000)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

14 MAR 2000

14.03.00

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.  
C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.  
n° de fax +34 91 3495304

Funcionario autorizado

M. NOVOA SANJURJO

n° de teléfono + 34 1 3495552

**INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL**  
 Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 99/00375

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
FR 2720069 A1	24.11.1995	NINGUNO	
WO 9625178 A1	28.08.1996	AU 4922096 A	04.09.1996
		AU 694621 B	23.07.1998
		CA 2213198 A	22.08.1996
		EP 0809517 A	03.12.1997
		JP 11500128 T T	06.01.1999
		US 5824655 A	20.10.1998
WO 9220793 A1	26.11.1992	AU 1994592 A	30.12.1992
		AU 654724 B	17.11.1994
		CA 2086327 A	11.11.1992
		EP 0542971 A	26.05.1993
		JP 6500574T T	20.01.1994
		US 5885794 A	23.03.1999